

# PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

ROBERT CHAMBERS  
NEW YORK

NOBURÔ KAMIYA  
OSAKA

SIEGFRIED STRUGGER  
MÜNSTER

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK  
ROSTOCK

FRIEDL WEBER  
GRAZ

KARL HÖFLER  
WIEN

BAND XLVIII, HEFT 1

MIT 34 TEXTABBILDUNGEN

ABGESCHLOSSEN AM 25. NOVEMBER 1956



WIEN  
SPRINGER-VERLAG  
1957

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut, Graz, Schubertstraße 51, Österreich, oder

Prof. Dr. J. Spok, Zoologisches Institut, (3a) Rostock, Universitätsplatz, DDR, oder

Prof. Dr. K. Höfler, Pflanzenphysiologisches Institut, Wien I, Dr.-Karl-Lueger-Ring 1, Österreich

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mölkerbastei 5

Fernsprecher: U 26-5-60 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfertig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Bezieher der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1 1/2 Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostenersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

XLVIII. Band

Inhaltsverzeichnis

1. Heft

Abhandlungen

Seite

Günther, Elisabeth: Der Einfluß chemischer und physikalischer Faktoren auf die protoplasmatischen Eigenschaften isolierter <i>Elodea</i> -Blätter unter besonderer Berücksichtigung der Zusammenhänge zwischen Wachstumsphase und Plasmaviskosität	1
Bělehrádek, J.: A Unified Theory of Cellular Rate Processes Based upon an Analysis of Temperature Action	53
Weiß, Gertrude: Über Schollen- und Kristallaggregatbildung im extraplasmatischen Raum vitalgefärbter Zellen	72
Kamiya, N., H. Nakajima und Sh. Abe: Physiology of the Motive Force of Protoplasmic Streaming	94
Koshimizu, Y., and N. Jizuka: Origins and Formation of Intracellular Inclusions Associated with two Leguminous Virus Diseases	113
Stäffelt, M. G.: The Influence of Distilled Water on the Fluidity of Protoplasm	134
Weber, F.: Trichome an Crown-Galls von <i>Nicotiana</i>	143
Parker, J.: Seasonal Changes in Some Chemical and Physical Properties of Living Cells of <i>Pinus ponderosa</i> and their Relation to Freezing Resistance	147
Milovidov, P.: Robert Feulgen	164

Kurze Mitteilungen

Höfler, K.: Mikrosomen und Meiosomen	167
Miličić, D.: Vitalfärbungsversuche mit reduziertem Neutralrot an „vollen“ Zellsäften einiger höherer Pflanzen	170

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

# **Der Einfluß chemischer und physikalischer Faktoren auf die protoplasmatischen Eigenschaften isolierter *Elodea*-Blätter unter besonderer Berücksichtigung der Zusammenhänge zwischen Wachstumsphase und Plasmaviskosität**

Von

**Elisabeth Günther**

Aus dem Botanischen Institut der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Februar 1956)

## **I. Einleitung**

Zu den für zellphysiologische Untersuchungen bevorzugten Objekten zählen die Blätter der *Elodea*-Arten. Es liegen daher über die protoplasmatische Anatomie bzw. die Physiologie der Zelle des normalen *Elodea*-Blattes (Pekarek und Fürth 1931, Moder 1932, Strugger 1934, Esterak 1935, Gahlen 1935, Marklund 1936, Drawert 1937, Borriss 1938, Ruge 1940, Fischer 1948) und über die Wirkungen der verschiedensten physikalischen und chemischen Faktoren zahlreiche Arbeiten vor. Von physikalischen Faktoren wurde der Einfluß der Temperatur (Bächer 1920, Bělehrádek und Melichar 1930, Gamma 1932, Moder 1932, Esterak 1935) und des Lichtes (Bächer 1920, Lepeschin 1930, Gamma 1932, Meindl 1934, Stålfelt 1946, Virgin 1948, 1949 a, 1951, 1952, 1954), von chemischen die Wirkung des destillierten Wassers (Moder 1932, Esterak 1935), mehrerer Narkotika (Seifrizz 1923, Collins 1931, Moder 1932, Esterak 1935), verschiedener Salzlösungen (Missbach 1928, Collins 1931, Moder 1932, Meindl 1934, Esterak 1935, Macke 1939, Northen 1946), von Pflanzenextrakten, Bodensubstanzen, Heteroauxin und Colchicin (Stålfelt 1948, 1949 a, b) und des pH-Wertes (Drawert 1952) auf den Plasmazustand von *Elodea* geprüft.

In der vorliegenden Arbeit interessierte besonders die Wirkung von Kalium- und Calciumionen auf die Protoplasten von *Elodea*-Blättern. Über die Bedeutung dieser Ionen für den Kolloidzustand des Plasmas liegen Ergebnisse vor, die sich z. T. widersprechen. Im allgemeinen schreibt man dem

K-Ion quellende, dem Ca-Ion entquellende Eigenschaften zu. Derartige Vorstellungen knüpfen an Ergebnisse aus der Kolloidchemie an und übertragen die dort gewonnenen Erkenntnisse auf das lebende Plasma. Zu- oder Abnahme des Hydratationsgrades äußert sich in Veränderungen der Viskosität. Durch Behandlung des Plasmas mit diesen Ionen müßte man, wenn die aus der Kolloidchemie abgeleiteten Erkenntnisse auch für das Plasma zutreffen, die Konsistenz antagonistisch beeinflussen können. Einige mit der Plasmolyseform- und Plasmolysezeitmethode gewonnene Ergebnisse scheinen auf eine solche Möglichkeit hinzuweisen. Von Cholodny und Sankewitsch (1933) an Epidermishäutchen von Zwiebelschuppen nach Vorbehandlung mit hypotonischen Kalium- oder Calciumsalzlösungen beobachtete Plasmolyseformen werden als Beweise für die verfestigende, viskositäts erhöhende Wirkung des Calciumions im Gegensatz zur verflüssigenden, viskositätsmindernden Wirkung des Kaliumions angesehen. Takamine (1959) stellte nach Vorbehandlung mit Kaliumchloridlösungen ebenfalls Konvexpasmolyse fest, nach Calciumchloridvorbehandlung Konkavplasmolyse (vgl. auch Strugger 1949). Cholodny und Sankewitsch selbst wiesen aber schon darauf hin, daß nur bei bestimmter Vorbehandlung (20—48 Std.) an *Allium cepa* solche Unterschiede zu finden sind, daß dagegen bei *Rhoeo discolor* die Differenzen zwischen der Wirkung mono- und bivalenter Kationen nach Vorbehandlung mit verdünnten Salzlösungen (m/40 bis m/60) verschwinden. Von anderer Seite liegen Versuchsergebnisse vor, die einfache antagonistische Quellungsfunktionen des  $K^+$  und  $Ca^{++}$  ausschließen (Lit. bei Heilbrunn 1928). Entsprechende Untersuchungen an Kalium- und Calcium-Mangelpflanzen führten ebenfalls zu keinen einheitlichen Ergebnissen (Kalchhofer 1936, Schmidt, Diwald und Stocker 1940, Pirson und Seidel 1950).

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden *Elodea*-Blätter durch Ablösen vom Sproß (Isolation) den korrelativen Einflüssen des Sprosses entzogen und den Einwirkungen der Versuchsbedingungen unmittelbar ausgesetzt. Die isolierten Blätter wurden in m/50, m/100 und m/150 Lösungen der Alkali- bzw. Erdalkalichloride und -nitrate eingelegt und die Veränderungen einiger protoplasmatischer Zustandsgrößen unter dem Einfluß der Ionen verfolgt. Neben ausgewachsenen Blättern dienten auch junge wachsende Blätter als Versuchsmaterial. Auf diese Weise war es möglich, die Frage nach den Zusammenhängen zwischen Wachstumsphase und Plasmaviskosität (vgl. Strugger 1934, Borriß 1938) unter neuen Gesichtspunkten zu erörtern.

## II. Versuchsmaterial

Das für die Arbeit verwendete Material von *Elodea densa* (Planch.) Casp. wurde im Becken des Versuchsgewächshauses des Botanischen Instituts angezogen. Obwohl alle dort wachsenden Pflanzen als ein Klon zu betrachten sind, konnten vereinzelt Pflanzen beobachtet werden, die sich in der Gestalt der Blätter von den übrigen unterschieden (sehr schmale Blätter). Pflanzen dieses morphologisch und physiologisch abweichenden Typus blieben unberücksichtigt; zu den Versuchen wurden nur von Pflanzen mit normalem Habitus Blätter entnommen.

Die Versuche wurden a) mit ausgewachsenen Blättern, b) mit jungen wachsenden Blättern durchgeführt. Da sich die Blätter auch nach der Beendigung des Streckungswachstums je nach dem Alter in ihrem Plasmazustand unterscheiden, fanden im Sommer und Herbst nur Blätter, die 5–15 cm, von Dezember bis März nur solche, die 4–10 cm unterhalb der Knospe inseriert waren, als „ausgewachsene“ Blätter Verwendung. Von den jungen Blättern wurden drei Altersstufen zu den Versuchen verwendet, um etwaige Zufälligkeiten durch das Heranziehen nur eines Altersstadiums von vornherein auszuschalten. Diese Stadien waren folgendermaßen charakterisiert: 1. 5–10 mm Länge, 2. 11–15 mm Länge, 3. 16–20 mm Länge.

Das *Elodea*-Blatt besteht im wesentlichen aus der großzelligen Epidermis der Oberseite und der kleinzelligen Epidermis der Unterseite. In der Längsrichtung wird es von der mehrschichtigen Mittelrippe durchzogen, die sich aus schmalen, langgestreckten Zellen zusammensetzt. Von den untereinander annähernd gleich gestalteten Feldzellen unterscheiden sich die der Mittelrippe unmittelbar benachbarten Zellreihen, die Randzellen und die Blattzähne. Wenn es bei den Versuchsergebnissen nicht anders vermerkt ist, beziehen sich die angegebenen Werte auf die Feldzellen der Blattoberseite.

Zu jedem Versuch wurde eine große Anzahl von Blättern gebraucht; es war daher unmöglich, eine Versuchsreihe mit einem einzigen Sproß durchzuführen. Um dennoch individuelle Unterschiede zwischen den verwendeten Sprossen auszuschalten und mit weitgehend identischem Material arbeiten zu können, wurden die Blätter der verschiedenen Sprosse möglichst regelmäßig auf die verschiedenen Versuchsgefäße verteilt. Vor dem Abtrennen wurden die Blätter gründlich in filtriertem Standortwasser abgespült, um sie weitgehend vom Algenbewuchs zu befreien, und dann in doppelt destilliertem Wasser nachgespült, um das anhaftende Standortwasser zu entfernen.

Als Versuchsgefäße dienten anfangs quaderförmige 1000-cm<sup>3</sup>-Küvetten, später 250-cm<sup>3</sup>-Bechergläser aus Jenaer Glas. Versuchsreihen, die nur zum Vergleich des Einflusses von Leitungswasser, Standortwasser und doppelt destilliertem Wasser angesetzt waren, wurden im Versuchsgewächshaus des Botanischen Instituts aufgestellt und waren den dortigen Temperatur- und Lichtintensitätsschwankungen ausgesetzt. Die Versuchsreihen, in denen die Wirkung von Einsalzlösungen geprüft wurde, befanden sich in Licht- bzw. Dunkelthermostaten, deren Temperatur zwischen 18° und 19° C schwankte.

Für die Bestimmung des osmotischen Wertes fand Glucose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>·H<sub>2</sub>O) DAB 6 Verwendung, für die Bestimmung der Plasmolyseform und -zeit KCl und CaCl<sub>2</sub> pro analysi. Die Einsalzlösungen stellte ich aus folgenden Chemikalien her: NaCl, NaNO<sub>3</sub>, KCl, KNO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, Ba(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> pro analysi, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> reinst, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> rein. Zur Bestimmung der Harnstoffpermeabilität diente Harnstoff für wissenschaftliche Zwecke. Alle Lösungen wurden volumenmolar hergestellt. Das doppelt destillierte Wasser wurde in einem Destillationsapparat nach Fitting (1928) und einem Wasserddestillationsapparat mit Birnenkühler nach Femel gewonnen. Die Messung der pH-Werte erfolgte mit einem „pH-Ionenmeter“ nach Lautenschläger (Firma Püsl, München) und Chinhydron-Elektroden-Kette.

### III. Plasmatische Veränderungen

Veränderungen der Eigenschaften des Protoplasmas finden zu einem erheblichen Teil Ausdruck in Verschiebungen der Plasmaviskosität. Die Mes-

sung dieser Größen ist daher für die Erfassung wesentlicher Zustandsänderungen des Plasmas von Bedeutung.

Einen Überblick über die Methoden der Viskositätsbestimmung an lebenden Objekten gibt Weber (1924 a). Von den dort aufgeführten Methoden scheidet die Magnetmethode wegen Schwierigkeiten in der technischen Durchführung aus, die Fallmethode ist nur für bestimmte Objekte geeignet, die Mikrodisektionsmethode, Kataphoresemethode, die Bestimmung der Klebrigkeit und des Haftvermögens lassen wie die von Frederikse (1934) angegebene Methode der Lichtbrechung und die von Erbring (1936) beschriebene Beurteilung der Spinnbarkeit des Protoplasten nur eine schätzungsweise Erfassung des Viskositätsgrades zu und sind nur in Verbindung mit anderen Methoden zu verwenden. Die von Pekarek (1930) ausgearbeitete Methode der Viskositätsbestimmung an biologischen Objekten mit Hilfe der Brownschen Molekularbewegung ermöglicht die Bestimmung absoluter Viskositätsgrößen, ist aber nur bei Objekten ohne Plasmaströmung anwendbar. Da an behandelten Blättern häufig Plasmaströmung beobachtet werden konnte, scheidet diese Methode ebenfalls aus.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Plasmaviskosität 1. nach der Plasmolyseform- und Plasmolysezeitmethode und 2. nach der Zentrifugierungsmethode bestimmt. Da sich die erste Methode mehr auf die Verhältnisse in der Plasmagrenzschicht bezieht, die zweite einen Einblick in die Beschaffenheit des Binnenplasmas ermöglicht, wird angenommen, daß die Kombination beider Methoden ein annähernd richtiges Bild der Vorgänge, die sich an den Plasmakolloiden abspielen, vermittelt.

Mit diesen Methoden erhaltene Resultate geben selbstverständlich nur Relativzahlen, die keine absolute Bestimmung der Viskosität erlauben. Es ist zu berücksichtigen, daß das Plasma keine Newtonsche Flüssigkeit mit einer bestimmten Viskosität oder Reibungskoeffizienten ist. Die Inhomogenität des Plasmas wird bedingt durch seine verschiedenartigen Einschlüsse, durch den abweichenden Bau in den Grenzschichten und durch Strukturen im mikroskopischen und submikroskopischen Bereich. Man wird also die Viskosität des Protoplasmas nur bedingt der von Flüssigkeiten gleichsetzen können. Weiterhin ist zu beachten, daß außer der Viskosität auch andere Plasmacigenschaften die Ergebnisse beeinflussen. Eine kritische Berücksichtigung aller Fehlermöglichkeiten ist deshalb erforderlich, um dennoch aus den gewonnenen Resultaten Rückschlüsse auf den Zustand der Plasmakolloide ziehen zu können.

#### A. Plasmolyseform und Plasmolysezeit

Weber (1921, 1929 a) zog aus dem Plasmolyseablauf Rückschlüsse auf die Plasmaviskosität. Durch Festlegen der Plasmolysezeit (im folgenden als Plz bezeichnet) als der Zeit vom Einlegen in das Plasmolytikum bis zum Eintreten der Konvexpasmolyse (diese Definition liegt auch den Angaben der vorliegenden Arbeit zugrunde), wurde es möglich, mit vergleichbaren Zahlenwerten zur Kennzeichnung der Viskosität zu arbeiten. Weiterhin zog Weber die Plasmolyseform (im folgenden als Plf bezeichnet) für die Bestimmung der Plasmaviskosität heran (1924 b, 1925). Die Plf wurde nach gleich langem Verweilen im Plasmolytikum bestimmt. Bei konvexer Plf ist

die Viskosität geringer als bei konkaver Plf, bei Krampfplasmolyse wird auf hohe Viskosität geschlossen. Inzwischen wurde von zahlreichen Autoren immer wieder auf die Fehlermöglichkeiten, die sich bei der Anwendung dieser Methoden ergeben, hingewiesen. Auf eine Aufzählung kann verzichtet werden, da ausführliche Diskussionen von Prud'homme van Reine (1935), Borriß (1938) und Ruge (1940) vorliegen. Es sollen hier nur speziell für *Elodea* in Frage kommende Faktoren besprochen werden, die ich in durch das Objekt selbst bedingte und andere Faktoren (nicht übereinstimmend mit den „äußeren Faktoren“ Ruges) einteilen möchte.

Um bei der Fülle der Fehlermöglichkeiten mit der Plf- und Plz-Methode reelle Viskositätsveränderungen zu erfassen, ist es notwendig, die Fehlerquellen weitgehend einzuschränken. Die Fehler, die durch Verschiedenheiten innerhalb des Objektes verursacht werden, sind durch Variationen der Versuchsbedingungen zumeist nicht zu vermeiden. Für die richtige Auswertung der Ergebnisse ist es aber wichtig, diese Fehlermöglichkeiten zu erkennen und ihre Bedeutung nach Möglichkeit abzuschätzen.

Auf den Einfluß der verschiedenen Durchlässigkeit der Zellmembran wies besonders Borriß (1938) hin. Nach Plasmolyse mit hypertonischen Lösungen hochmolekularer Stoffe, wie Rohr- und Traubenzucker, konnte er an wachsenden Blattteilen von *Elodea densa* cytorrhysartige Erscheinungen beobachten. Die Membranen blieben auch nach Eintritt der Plasmaabhebung geschrumpft und gefältelt, ein Zeichen dafür, daß für das Plasmolytikum Schwierigkeiten in der Durchdringung der Zellwand bestehen (vgl. auch Diehl 1936, Drawert 1937, Ruge 1940, weiterhin Brauner 1932 und Kressin 1935 für Mooszellen).

Daß Unterschiede in der Porengröße zwischen alten und jungen Blättern bestehen, geht auch aus der Eintrittsgeschwindigkeit der Plasmolyse hervor (vgl. Borriß 1938 und Fischer 1948). Im Gegensatz zu ausgewachsenen Blättern bzw. ausgewachsenen Blattzonen, in denen die Plasmolyse nach wenigen Sekunden eingetreten ist, bleiben Teile der Wachstumszone etwa 5 Minuten lang un-plasmolysiert. In unserem Falle wurde versucht, diese Differenzen durch späteres Einlegen der ausgewachsenen Blätter und durch Plasmolysieren von Blattstücken auszugleichen. Da es sich aber bei den Plzen stets um größere Unterschiede handelt, spielt der wenig spätere Plasmolyseeintritt keine entscheidende Rolle.

Außer der verschiedenen Durchlässigkeit der Zellwand sind Permeabilität und Intransibilität von Bedeutung. Moder (1932) konnte für *Elodea canadensis* nachweisen, daß innerhalb eines Blattes Unterschiede in der Permeabilität bestehen: Die Basis und die Mittelrippe sind für Harnstoff durchlässiger als die Blattspitze, was durch eigene Versuche an *Elodea densa* bestätigt werden konnte. Marklund (1936) studierte die Permeabilität junger, ausgewachsener und alter Blätter und konnte für junge Blätter geringe Permeabilität, für ausgewachsene Blätter erhöhte Permeabilität und für alte Blätter erneutes Abnehmen der Permeabilität feststellen.

Plz und Plf sind weiterhin von der Dicke des Wandbelages abhängig. Die relative Plasmamenge junger Blätter ist größer als die der alten. Die Protoplasten junger Blätter könnten sich demnach auch bei gleicher Plasmaviskosität später abrunden als die der alten. Man nimmt an, daß das Plasma wachsender Zellen mit der Zellwand verwachsen ist. Es wird also der Loslösung von der Zellwand einen größeren Widerstand entgegensetzen als das ausgewachsener Zellen. Auch dadurch können Verzögerungen in der Abrundung hervorgerufen und krampfartige Pfien erzeugt werden.

Neben diesen nicht zu beseitigenden Fehlerquellen durch innere Faktoren ist es wichtig, die durch äußere Faktoren verursachten Fehlermöglichkeiten weitgehend einzuschränken.

1. Die Temperatur wurde in allen Versuchen mit Einsalzlösungen konstant auf 18–19° C gehalten. Nur in den Versuchsserien, in denen Standortwasser, Leitungswasser und Aq. bidest. miteinander verglichen wurden, waren die Blätter größeren Temperaturschwankungen ausgesetzt.

2. Die Art des Plasmolytikums. Für die vorliegende Arbeit wurde im Vorversuch zunächst ein geeignetes Plasmolytikum ausgewählt. Anfangs benutzte ich zu den Plasmolyseversuchen Glucoselösung. Dabei ergab sich, daß die Plz selbst in 1 mol. Lösung zu kurz war, um irgendwelche Unterschiede erkennen zu lassen, die über die Fehlergrenze hinausgingen. Stärkere Konzentrationen vermied ich, um nicht durch zu starken Wasserentzug Viskositätsunterschiede vorzutauschen. In 1 mol. KCl- und 1 mol. KNO<sub>3</sub>-Lösung war es mir ebenfalls nicht möglich, längere Plzen bei abgetrennten Blättern zu erzielen, und die Plf, die zwar sofort nach dem Einlegen Unterschiede von konvex bis schwach konkav aufwies, war nicht charakteristisch genug, um daraus Schlüsse zu ziehen. Die Plasmolyse mit 0,8 mol. CaCl<sub>2</sub>-Lösung erwies sich ebenfalls als ungünstig, da Krampfplasmolyse eintrat. Schließlich wurde in Anlehnung an das Vorgehen von Borriß (1938) ein Gemisch von KCl- und CaCl<sub>2</sub>-Lösungen im Verhältnis 4 : 1 als Plasmolytikum gewählt, das bei allen weiteren Versuchen Verwendung fand.

3. Die Konzentration des Plasmolytikums. Auf die Bedeutung, die die Konzentration des Plasmolytikums für die Plf und Plz hat, wies besonders Borriß (1938) hin. Auf Grund verschiedener Hypertoniegrade können verschiedene Plasmaviskositäten vorgetäuscht werden. Das Studium des osmotischen Wertes ist demnach vor Plasmolyseversuchen unerlässlich. Während bei zu schwach hypertonischen Lösungen gleiche Plz trotz verschiedener Viskosität festgestellt werden kann, führen zu hohe Konzentrationen zu irreversiblen Veränderungen. Da schon bei Versuchsbeginn Unterschiede im osmotischen Wert zwischen ausgewachsenen und jungen Blättern bestehen und der OG (= osmotischer Wert bei Grenzplasmolyse) außerdem im Laufe des Versuchs großen Veränderungen unterliegt, ist es schwierig, das Plasmolytikum im richtigen Hypertoniegrad anzuwenden. Es wurden daher alle Versuche 1. bei gleicher Konzentration des Plasmolytikums (Konz. 1) und 2. in Lösungen ausgeführt, die den Veränderungen des osmotischen Wertes angepaßt waren (Konz. 2 und 3). Nach ihrem isosmotischen Koeffizienten verhält sich die zur Bestimmung des osmotischen Wertes verwendete Glucoselösung zu dem als Plasmolytikum verwendeten KCl-CaCl<sub>2</sub>-Gemisch wie 62 : 100, es entspricht also eine 0,4 mol. Glucoselösung einer 0,25 mol. KCl-CaCl<sub>2</sub>-Lösung. Da ein gewisser Hypertoniegrad zur Messung der Plz und Plf nötig ist, wurde dreifache Hypertonie gewählt. Im Laufe der Versuche konnten nur selten schrumpfplasmolyseähnliche Formen (Borriß 1938) oder das Absterben von Zellbezirken durch den plasmolytischen Eingriff beobachtet werden. Es ist demnach nicht anzunehmen, daß die Konzentration des Plasmolytikums so starke sekundäre Veränderungen am Plasma gerüst verursacht, daß die Versuchsergebnisse dadurch entscheidend beeinträchtigt werden könnten. Als Konzentration 1 des Plasmolytikums wurde eine 0,75 mol. KCl-CaCl<sub>2</sub>-Lösung verwendet, als Konzentration 2 eine in bezug auf den gemessenen OG dreifach hypertonische Lösung. Es ist möglich, die Konzentration des Plasmolytikums auch noch in anderer Weise dem OG anzupassen. Die Grundkonzentration des Plasmolytikums (0,75 mol. KCl-CaCl<sub>2</sub>-Gemisch für ausgewachsene, 0,48 mol. für wachsende Blätter) wurde um einen dem absoluten Anstieg des OG der Blätter entsprechenden Betrag erhöht (Konz. 3). Später wurde diese Lösung

nicht mehr verwendet, da bei geringen Veränderungen des OG die Unterschiede zwischen Konzentration 2 und 3 verhältnismäßig klein sind und sich in der Plf und Plz kaum auswirken. Bei größeren Abweichungen des OG vom normalen Wert bedeutet die Konzentration 3 im Verhältnis zur Konzentration 1 (= 0,75 mol.) nur eine geringe Erhöhung der Konzentration des Plasmolytikums. Steigt der OG z. B. auf 0,6 mol. Glucose an, so wird als Konzentration 3 des Plasmolytikums eine 0,88 mol. KCl-CaCl<sub>2</sub>-Lösung verwendet, als Konzentration 2 eine 1,12 mol. Lösung. Es besteht also bei Konzentration 3 nur noch 2,5fache Hypertonie. Ob es richtiger ist, den Hypertoniegrad absolut oder relativ zu steigern, kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht entschieden werden.

### 1. Osmotische Veränderungen

#### a) Methode

Für die Messung osmotischer Zustandsgrößen von pflanzlichen Zellen und Geweben sind im Laufe der Zeit die verschiedensten Methoden ausgearbeitet worden (ausführliche Angaben bei Ursprung 1939). Davon erfreuen sich nur drei einer weiteren Verbreitung: Die kryoskopische, die plasmometrische und die grenzplasmolytische Methode. Vor- und Nachteile dieser Methoden wurden eingehend von Blagowestschenski (1928), Walter (1931), Oppenheimer (1932), Buhmann (1935) und Ursprung (1939) diskutiert.

Für die vorliegenden Untersuchungen kam nur die grenzplasmolytische Methode in Frage, da man nur auf diese Weise verhältnismäßig schnell einen Überblick über die einzelnen Blattzellen gewinnt und die Möglichkeit hat, osmotische Gradienten zu erkennen. Als grenzplasmolytischer Wert (OG) wird die Konzentration des Plasmolytikums angegeben, in der 50% der Zellen eine eben sichtbare Ablösung des Protoplasten zeigen. Obwohl Rohrzucker im allgemeinen als günstigstes Plasmolytikum gilt, wurde hier Glucose gewählt, da sie wie dieser als Nichtelektrolyt kaum Einfluß auf die Plasmakolloide ausübt und der Molekülgröße wegen kaum permeiert, auf der anderen Seite aber kein so großes Molekül wie der Rohrzucker besitzt, so daß die Zellmembran kein zu großes Hindernis bildet, was sich besonders bei jungen Blättern störend bemerkbar machen würde. Die Kontrolle erfolgte bei ausgewachsenen Blättern 30 Minuten nach dem Einlegen in das Plasmolytikum, bei jungen Blättern stellte sich das osmotische Gleichgewicht erst nach 12 Stunden ein.

#### b) Osmotische Verhältnisse normaler unbehandelter Blätter

Da *Elodea* schon häufig zu zellphysiologischen Studien verwendet wurde, liegen über die osmotischen Verhältnisse zahlreiche Angaben vor (Walter 1931, Gamma 1932, Collins 1931, Kressin 1935, Borriß 1958, Ruge 1940, Fischer 1948). Außer Collins (1931) konnten alle Autoren in ausgewachsenen Blättern ein Gefälle von der Spitze zur Basis hin beobachten und feststellen, daß wachsende Blätter einen geringeren osmotischen Wert aufweisen als ausgewachsene.

Eigene Untersuchungen konnten die erwähnten Angaben bestätigen: In ausgewachsenen Blättern besteht ein Gradient von der Spitze zur Basis, in jungen Blättern ist der OG geringer als in alten. Bei der Untersuchung von drei verschiedenen Altersstufen junger wachsender Blätter (8, 12, 16 mm)

wurde an diesen ein anders gerichteter Gradient beobachtet als an den ausgewachsenen Blättern. Nachdem die Blätter 30 Minuten lang in Glucoselösung gelegen hatten, konnten nur in ausgewachsenen Zonen Abhebungen beobachtet werden, im Meristem und in der Streckungszone dagegen nicht. Erst nach 12 Stunden hatte das Plasmolytikum auch in den Wachstumszonen Abhebungen bewirkt. In den Blättern 1 und 2 fällt die Blattmitte, in Blatt 3 die Blattbasis durch den geringsten osmotischen Wert auf. Die Werte der Spitzenzone liegen etwas höher, erreichen aber nur in der Spitze des ältesten Blattes den OG eines völlig ausgewachsenen Blattes. Zur meristemati-

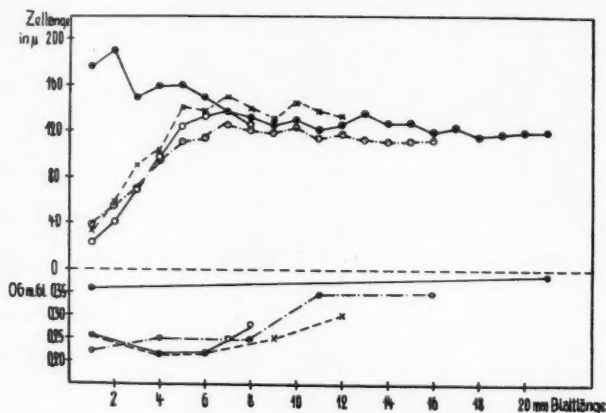


Abb. 1. Vergleich der Gradienten der Zelllänge und des osmotischen Wertes.

- — ● ausgewachsenes Blatt
- — ○ 16—20 mm langes Blatt
- x — x 11—15 mm " "
- — ○ 5—10 mm " "

schen Zone der Blätter 1 und 2 hin steigt der osmotische Wert ebenfalls an. Die Versuche wurden mit KCl-Lösung als Plasmolytikum wiederholt. Auch hier war nach 30 Minuten das osmotische Gleichgewicht in den Wachstumszonen noch nicht erreicht, sondern etwa erst nach 2 Stunden. Bei Berücksichtigung des isosmotischen Koeffizienten konnten die Glucosewerte bestätigt werden.

Versucht man, Zusammenhänge zwischen Zellsaftkonzentration und den Wachstumsvorgängen festzustellen (Abb. 1), so ergibt sich, daß in allen Blättern die geringsten osmotischen Werte am Ende der Streckungszone und in der angrenzenden Blattzone, die bereits ausgewachsen ist, sich aber von der Spitzenzone durch ihre blaßgrüne Farbe unterscheidet, gemessen wurden. Wenn in Blatt 3 die geringsten osmotischen Werte an der Basis zu beobachten sind, so stimmt das, wie einem Vergleich der Zellängen zu entnehmen ist, mit den Verhältnissen in Blatt 1 und 2 überein, denn die Zellen an der Basis von Blatt 3 haben ihre größte Streckung schon vollendet. Im

wachsenden *Elodea*-Blatt weisen also die basalen meristematischen Zellen einen relativ hohen osmotischen Wert auf. Mit dem Beginn der Zellstreckung sinkt die Zellsaftkonzentration ab und erreicht am Ende der Streckungszone ihr Minimum, das auch in der anschließenden blaßgrünen Zone erhalten bleibt. Ein Anstieg ist erst in der tiefgrünen Spitzenzone des Blattes zu beobachten.

c) Veränderungen des osmotischen Wertes ausgewachsener isolierter Blätter

In der Literatur finden sich häufig Angaben über jahreszeitlich bedingte Schwankungen der Zellsaftkonzentration. Walter (1931) gibt den maximalen Wert für *Elodea* im Winter mit 12,7 atm., im Sommer mit nur

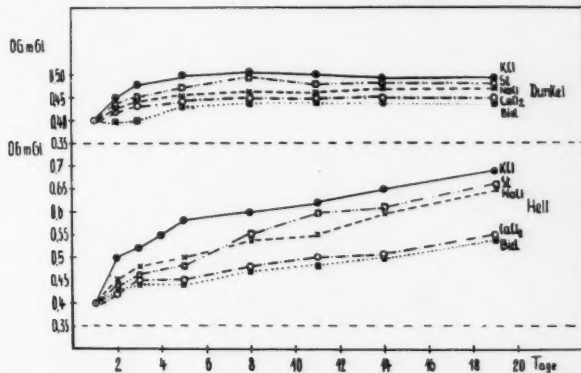


Abb. 2. Veränderungen des osmotischen Wertes ausgewachsener Blätter nach Vorbehandlung mit m/150 NaCl-, KCl-,  $\text{CaCl}_2$ -Lösung, Standortwasser und Aq. bidest. in dunkel gehaltenen und belichteten Sommerversuchen.

10,8 atm. an. Gahlen (1935) fand bei fast gleichbleibenden Werten den höchsten Wert im Juni. In eigenen Versuchen schwankten die Werte ausgewachsener Blätter in der Zeit von Mai bis November zwischen 0,37 und 0,4 mol. Glucose, von November bis März zwischen 0,32 und 0,35 mol. Der Maximalwert wurde im Juli erreicht.

Schon einen Tag nach dem Abtrennen der Blätter ist bei belichteten Versuchsserien ein allgemeiner Anstieg des osmotischen Wertes zu verzeichnen (Abb. 2), der sich am deutlichsten bei den in Kaliumsalzlösungen liegenden Blättern ausprägt und hier auch in den folgenden Tagen am stärksten bleibt, während in den anderen Lösungen der Anstieg etwas geringer ist. Wie Abb. 2 zeigt, handelt es sich in den ersten Tagen nur um einen Unterschied von 0,05 mol. Glucose zwischen der Zellsaftkonzentration von Blättern in KCl- und in NaCl- bzw.  $\text{CaCl}_2$ -Lösungen. Nach 5 Tagen vergrößert sich diese Differenz, da der OG der in  $\text{CaCl}_2$ -Lösungen eingelegten Blätter ziemlich konstant bleibt, in KCl-Lösungen aber ein weiterer Anstieg zu beobachten ist, der bei Sommerversuchen nach 14 Tagen fast das Doppelte des Ausgangswertes erreicht und sich dann nicht weiter erhöht. In

Na-Salzlösungen steigt der osmotische Wert schneller und stärker an als in Ca-Salzlösungen, erreicht aber die Kaliumwerte nicht.

Da in KCl- und  $\text{KNO}_3$ -Lösungen dieser Anstieg gleichlaufend erfolgt (Abb. 3), muß man in diesem Falle den Kationen die entscheidende Rolle zuschreiben. Auch ein Vergleich zwischen NaCl und  $\text{NaNO}_3$  und zwischen  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  läßt erkennen, daß keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Veränderungen, die durch Chlorid- oder Nitratlösungen hervorgerufen werden, bestehen und daß die ausschlaggebende Wirkung den

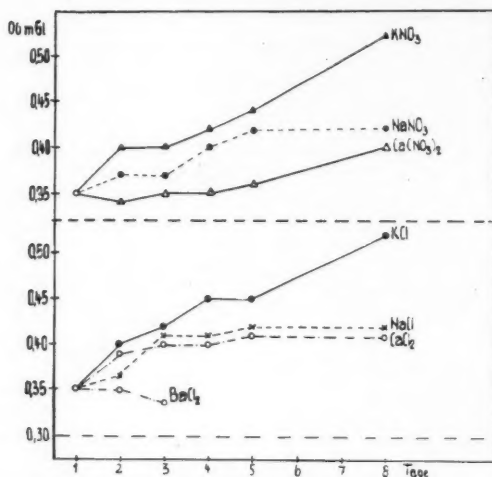


Abb. 3. Veränderungen des osmotischen Wertes ausgewachsener Blätter nach Vorbehandlung mit m/100 Salzlösungen in belichteten Winterversuchen.

an kein Anstieg des OG zu bemerken, sondern nach etwa zweitägigem Gleichbleiben ist in der subletalen Phase ein Absinken des osmotischen Wertes zu beobachten, das sich in m/100 Lösung schneller vollzieht als in m/1000 Lösung. In  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung entsprechen die Veränderungen ungefähr den in  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung beobachteten. Die von anderen Einsalzlösungen abweichende Wirkung des  $\text{BaCl}_2$  dürfte auf der Giftwirkung des Bariums beruhen.

Derartige Verschiebungen des osmotischen Wertes werden nicht nur durch Einsalzlösungen hervorgerufen. Kultiviert man isolierte *Elodea*-Blätter in Standort- oder Leitungswasser, so steigt der OG ebenfalls stark an, so daß Werte erreicht werden, die nur etwas unter den durch Kalium-einwirkung bedingten Werten liegen. Da im Standort- und Leitungswasser Ca-Ionen weit überwiegen, hätte man eher ein Verhalten erwartet, das dem der in Ca-Lösung kultivierten Blätter entspricht. In Aq. bidest. dagegen ist nur ein geringer Anstieg zu verzeichnen. Die Abb. 2 ermöglicht einen Vergleich der Veränderungen des osmotischen Wertes von Blättern in KCl-,

Kationen zukommt. Unterschiede in der Kalium- und Natriumwirkung weisen darauf hin, daß es sich bei dem starken Anstieg des OG nicht um einen allgemeinen Effekt einwertiger Kationen handelt, sondern um einen spezifischen Kaliumeffekt.

Als zweiwertige Kationen wurden außerdem Barium und Magnesium in ihrer Wirkung auf den OG untersucht. In  $\text{BaCl}_2$ -Lösung sterben die Blätter in m/100 Lösung schon nach 3–5 Tagen ab, in m/1000 Lösung nach etwa 10 Tagen. Im Gegensatz zu allen anderen verwendeten Lösungen ist von Anfang

NaCl-, CaCl<sub>2</sub>-Lösungen, Standortwasser (St) und Aq. bidest. (B) in belichteten und dunkel gehaltenen Sommerversuchen.

Verfolgt man die Versuche über längere Zeit, so ist in der ersten Woche starkes Ansteigen zu bemerken, in der zweiten Woche weitere Zunahme des OG und bis zur vierten Woche Gleichbleiben bzw. leichtes Absinken. Aus dem Verhalten der in Standortwasser gehaltenen Blätter ist zu ersehen, daß der OG schon allein infolge der Isolation ansteigt, was durch die in den Blättern an der Basis und in der Mittelrippe vorhandene Reservestärke, die in osmotisch wirksame Substanzen überführt wird, verursacht wird. Der Anstieg der Zellsaftkonzentration der dunkel gehaltenen Blätter ist sicher hauptsächlich darauf zurückzuführen, wie verdunkelte isolierte Blätter in Standortwasser beweisen. Um den Einfluß der Reservestärke auszuschalten, wurden Sprosse 2 Tage vor dem Abtrennen der Blätter verdunkelt. Dadurch wurde der größte Teil der Stärke abgeleitet, so daß die Zunahme des osmotischen Wertes auf Grund der Stärkehydrolyse wegfiel. Bei dann auch während des Versuches dunkel gehaltenen Serien konnte nur ein ganz geringer Anstieg (0,03 mol. Glucose) beobachtet werden, bei hell gehaltenen Versuchen dagegen fiel zwar der starke Anstieg in den ersten Tagen weg, doch blieb eine langsame Erhöhung erhalten. Man muß also die Mitwirkung der Assimilation und die Bildung von osmotisch wirksamen Assimilationsprodukten annehmen. Da bei der Vorverdunklung viele kaum kontrollierbare Faktoren (Erwärmung, schlechter Gasaustausch usw.) die Versuchsergebnisse stören können, wurde von ihrer allgemeinen Anwendung abgesehen. Im Vergleich zu belichteten Versuchsserien verändert sich der OG in dunkel gehaltenen Serien bedeutend weniger und erreicht schon nach wenigen Tagen sein Maximum. Selbst in KCl-Lösung und Standortwasser wurde ein Wert von 0,5 mol. Glucose nicht überschritten. Ein Absinken unter den Anfangswert konnte auch bei vorverdunkelten Blättern nur in BaCl<sub>2</sub>-Lösung beobachtet werden. Das Verhältnis, in dem die Lösungen auf den OG einwirken, entspricht dem in belichteten Versuchen beobachteten. Die Reihenfolge des Anstiegs ist wie in hell gehaltenen Versuchen: Ba < Aq. bidest. < Mg < Na < St = L < K.

Wie die Zellsaftkonzentration selbst sind auch ihre Veränderungen jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen. Eine Gegenüberstellung von Sommer- und Winterkurven (Abb. 3 und 2) ergibt, daß beide gemeinsame charakteristische Züge besitzen, so z. B. den starken Anstieg des OG der mit Kaliumsalzlösungen behandelten Blätter im Gegensatz zu den mit Calciumsalzlösungen behandelten. Im Sommer kann nach einer Woche Versuchsdauer bei einem 0,4 mol. Glucose entsprechenden Ausgangswert in K-Salzlösungen und in Standortwasser ein Anstieg auf einen OG, der 0,6 mol. Glucose entspricht, gemessen werden, in Ca-Salzlösungen und Aq. bidest. auf 0,5 mol. Im Winter werden bei einem Kontrollwert am Sproß von 0,33 mol. Glucose in K-Salzlösungen 0,52 mol. Glucose erreicht, in Ca-Salzlösungen nur 0,41 mol. Die geringe Veränderung des OG in dunkel gehaltenen Versuchen ist sowohl in Sommer- als auch in Winterversuchen zu beobachten.

#### d) Veränderungen des osmotischen Wertes isolierter junger wachsender Blätter

Wie Abb. 1 zeigte, besteht ein Zusammenhang zwischen osmotischem Wert und Streckungswachstum in dem Sinne, daß der osmotische Wert nach der maximalen Streckung auf sein Minimum absinkt. Dieser Gradient gleicht sich schon in den ersten Tagen nach dem Abtrennen aus. Die höchsten Zellsaftkonzentrationen sind dann an der Blattbasis zu finden; nach den Blattspitzen hin ist ein geringes Absinken zu verzeichnen. Der OG der Streckungszone ist von 0,22 mol. auf 0,25 mol. Glucose angestiegen.

Durch das Ablösen vom Sproß selbst wird bei den wachsenden Blättern zumeist kein allgemeiner Anstieg des osmotischen Wertes bewirkt. Bei dunkel gehaltenen Versuchsserien wurden keine Änderungen des OG durch verschiedene Behandlung festgestellt. In den belichteten jungen Blättern steigt der OG in der ersten Versuchswoche wie bei den dunkel gehaltenen kaum an. Erst etwa 8 Tage nach Versuchsbeginn kann in K-Salzlösungen, Standortwasser und Leitungswasser eine Erhöhung der Zellsaftkonzentration festgestellt werden, wie sie schon bei ausgewachsenen Blättern beschrieben wurde. Im Durchschnitt entsprechen die osmotischen Werte belichteter junger Blätter in der zweiten Versuchswoche einer 0,35 mol. Glucoselösung, in K-Salzlösungen, Standortwasser und Leitungswasser bis zu 0,45 mol. Glucose. Stärkeres Absinken der Zellsaftkonzentration tritt nur in Einsalzlösungen auf, in denen sich die Blätter im subletalen Zustand befinden, wie z. B. in  $\text{BaCl}_2$ -Lösung.

#### 2. Plasmolyseform- (Plf-) und Plasmolysezeit- (Plz-) Versuche

Da *Elodea* eines der beliebtesten Objekte für zellphysiologische Untersuchungen ist, fehlt es nicht an Angaben über Plasmolysezeit und -form. Ich möchte nur die für die vorliegenden Untersuchungen wichtigen Arbeiten herausgreifen. Strugger (1934) und Borriß (1938) untersuchten vergleichend ausgewachsene und wachsende Blätter, Borriß (1938) und Ruge (1940) Veränderungen, die bei der Entwicklung der Blattzähne auftraten. Fischer (1948) zog auch alternde Blätter mit in den Kreis der Betrachtung. Mit der protoplasmatischen Anatomie des *Elodea*-Blattes beschäftigten sich besonders Moder (1932) und Esterak (1935). Moder maß die kürzesten Plasmolysezeiten in Harnstofflösungen an der Blattbasis, zur Spitze hin verlängerte sich die Plz. Esterak dagegen beobachtete nach Plasmolyse mit verschiedenen Plasmolytika die ersten Konvexplasmolysen kurz unterhalb der Blattspitze.

Eigene Untersuchungen ergaben, daß die ersten konvexen Plasmolysen in der Blattspitze auftraten. In einem Klon mit schmalen, langen Blättern lag das Plz-Minimum etwas unterhalb der Spitze, bei dem zu allen übrigen Versuchen verwendeten breitblättrigen Klon wurden zur Spitze hin nur selten längere Plzen gemessen. Im allgemeinen rundeten sich die Protoplasten der Zellen an der Blattspitze in der Nähe der Mittelrippe zuerst ab. Von dort aus breitete sich die Konvexplasmolyse zum Blattrand und zur Blattbasis hin aus. Abgesehen von den ersten drei basalen Zellreihen (Wundwirkung), konnten die am stärksten konkaven Protoplasten an der Blattbasis gefunden werden, wo auch das Plz-Maximum zu beobachten war.

Wie schon einleitend bemerkt, wurden nur Blätter aus der Region 4–15 cm unterhalb der Knospe als ausgewachsene Blätter verwendet. Die basalen alternden und die apikalen jungen Blätter blieben unberücksichtigt. Trotzdem war es nicht möglich, völlig gleiche Plz zu erzielen. Selbst Blätter, die demselben Wirtel entnommen waren, unterschieden sich in der Plf und Plz. Die Werte für die Blattbasis schwankten zwischen 35 und 45 Minuten, für die Blattspitze zwischen 20 und 30 Minuten. Die Plf unbehandelter Blätter war zu Anfang der Plasmolyse stark konkav. Die Abrundung begann nach etwa 20 bis 25 Minuten von der Spitzenzone her.

Die Kontrolle der Plf und Plz erfolgte sofort nach der Bestimmung des osmotischen Wertes, aber an anderen Blättern. Zur Plasmolyse wurden die Blätter in Esmarschälchen mit je 10 ml Plasmolytikum eingelegt und diesen nur zu den Kontrollen mit viel Flüssigkeit entnommen.

a) Veränderungen der Plf und Plz ausgewachsener isolierter Blätter  
unter der Einwirkung von Einsalzlösungen

Da sich bei der Verwendung von Lösungen verschiedener Salze als Plasmolytikum Unterschiede in der Plf und Plz ergeben, war zu erwarten, daß auch hypotonische Salzlösungen ähnliche Wirkungen hervorzurufen vermögen.

Frisch vom Sproß abgetrennte *Elodea*-Blätter wurden in m/50, m/100 oder m/150 Lösungen der Alkali- und Erdalkalichloride und -nitrates eingelegt und in Licht- und Dunkelthermostaten aufgestellt, so daß neben der Beobachtung der Salzwirkung auch der Einfluß der Belichtung verfolgt werden konnte.

In den Abb. 4a und b sind die Plzen von Blättern, die in Standortwasser (St), Aq. bidest. (Bid.), m/50 NaCl-, KCl- und  $\text{CaCl}_2$ -Lösungen eingelegt waren, dargestellt. Die Plasmolyse erfolgte mit einem dem OG relativ angepaßten Plasmolytikum (dreifache Hypertonie). Auch bei isolierten Blättern rundeten sich die Protoplasten der Spitzenregion früher ab als die Protoplasten der basalen Blatthälfte. Die in der Abbildung eingetragenen Werte stellen Mittelwerte beider Zonen dar. Vergleicht man die Werte mit der Plz von normalen unbehandelten, frisch vom Sproß abgetrennten Blättern, die 25–45 Minuten beträgt, so ist am ersten Versuchstag kaum eine Veränderung festzustellen. Doch schon am zweiten Versuchstag sind charakteristische Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsarten zu bemerken. Die in  $\text{CaCl}_2$ -Lösung oder Standortwasser eingelegten Blätter vollenden ihre Konvexplasmolyse nach kürzerer Zeit als die mit Aq. bidest., NaCl- und KCl-Lösung behandelten Blätter. Diese Unterschiede bleiben bei zweiwöchiger Versuchsdauer bestehen, so daß man zwei Gruppen unterscheiden kann: 1. Blätter aus Standortwasser und  $\text{CaCl}_2$ -Lösung mit kurzer Plz und 2. Blätter aus Aq. bidest., NaCl- und KCl-Lösungen, in denen längere Plzen auftreten. Innerhalb dieser beiden Gruppen konnten nur geringe Unterschiede beobachtet werden. In der ersten Gruppe waren die Werte der Standortwasser- bzw. Leitungswasserblätter fast immer, besonders vom vierten Versuchstag an, niedriger als die Werte der  $\text{CaCl}_2$ -Blätter, in der

zweiten Gruppe zeichnen sich die KCl-Blätter durch besonders lange Plz aus, doch kommt es in den ersten Versuchstagen häufiger vor, daß die NaCl-Werte höher liegen als die KCl-Werte. Nach 4–5 Tagen besteht zumeist die Reihenfolge: KCl, NaCl, Aq. bidest.,  $\text{CaCl}_2$ , St = L. Gegenüber der Plz un-

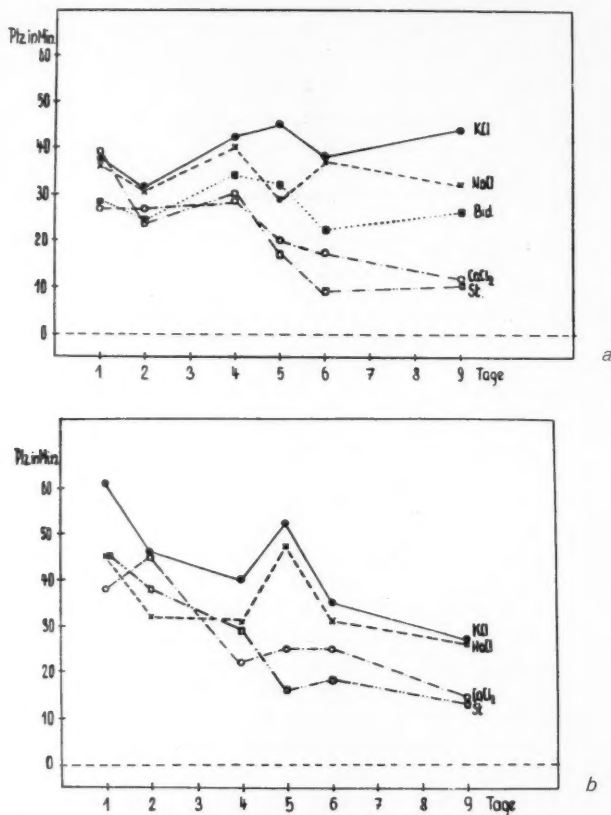


Abb. 4. Veränderungen der Plz ausgewachsener Blätter nach Vorbehandlung mit m/50 NaCl-, KCl-,  $\text{CaCl}_2$ -Lösung, Standortwasser und Aq. bidest. in belichteten (a) und dunkel gehaltenen (b) Versuchsserien. Plasmolytikum mit relativem Hypertoniegrad.

behandelter Kontrollblätter ist die Plz behandelter Blätter etwa vom zweiten Versuchstage ab herabgesetzt.

Zum Vergleich seien im folgenden die Kurven der Plzen mit konstanter Konzentration des Plasmolytikums angeführt, die sich bei oben beschriebener Vorbehandlung der Blätter nach Plasmolyse in 0,75 mol. KCl- $\text{CaCl}_2$ -Lösung ergeben (Abb. 5 a und b). Wie in Abb. 4 ist ein allgemeiner Abfall

der Plzen festzustellen, der in belichteten Serien schneller und stärker erfolgt als in dunkel gehaltenen. In verdunkelten Versuchen werden 24 Stunden nach der Isolation noch Plzen gemessen, die etwa den Zeiten normaler Blätter entsprechen, in belichteten Serien dagegen ist schon nach 24 Stunden und besonders nach 48 Stunden eine starke Verkürzung der Plzen zu be-

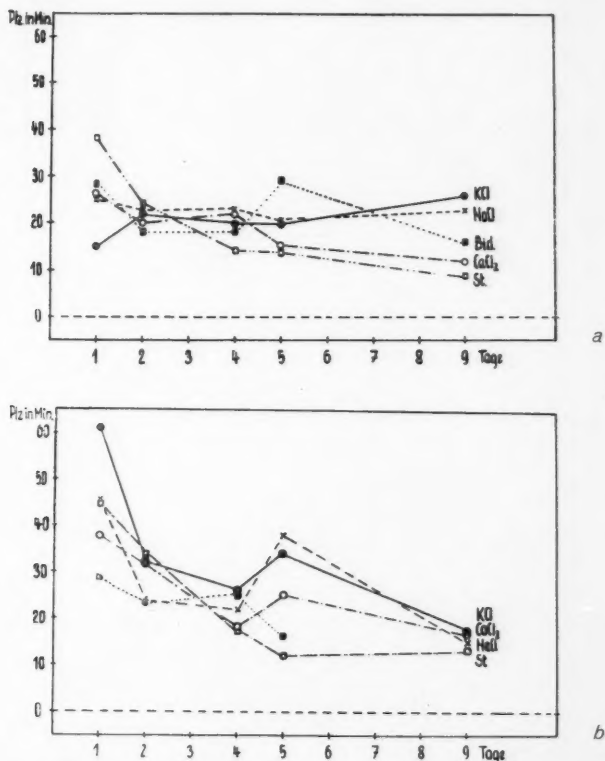


Abb. 5. Veränderungen der Plz ausgewachsener Blätter nach Vorbehandlung mit m/50 NaCl-, KCl-, CaCl<sub>2</sub>-Lösung, Standortwasser und Aq. bidest. in belichteten (a) und dunkel gehaltenen (b) Versuchsserien. Plasmolyse in 0,75 mol. KCl-CaCl<sub>2</sub>-Gemisch.

merken. Da die osmotischen Werte ansteigen, wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, kann eine Verkürzung der Plz nicht ausbleiben, denn das 0,75 mol. Plasmolytikum wird im Laufe des Versuchs immer weniger hypertonisch. Die bei Plasmolyse mit dem OG angepaßten Lösungen beobachteten charakteristischen Unterschiede nach den verschiedenen Behandlungen sind hier erst nach 5 Tagen und nicht so deutlich ausgeprägt zu bemerken. Durch die Veränderungen des OG werden die Plz-Unterschiede verdeckt. Da gerade bei

KCl-Behandlung die Zellsaftkonzentration stark ansteigt, ist das 0,75 mol. Plasmolytikum für die mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösung vorbehandelten Blätter stärker hypertonisch als für mit KCl-Lösung behandelte Blätter.

Die Ergebnisse der Behandlungen mit m/100 Salzlösungen entsprechen den mit m/50 Lösungen erhaltenen Resultaten. In diesen Versuchsreihen

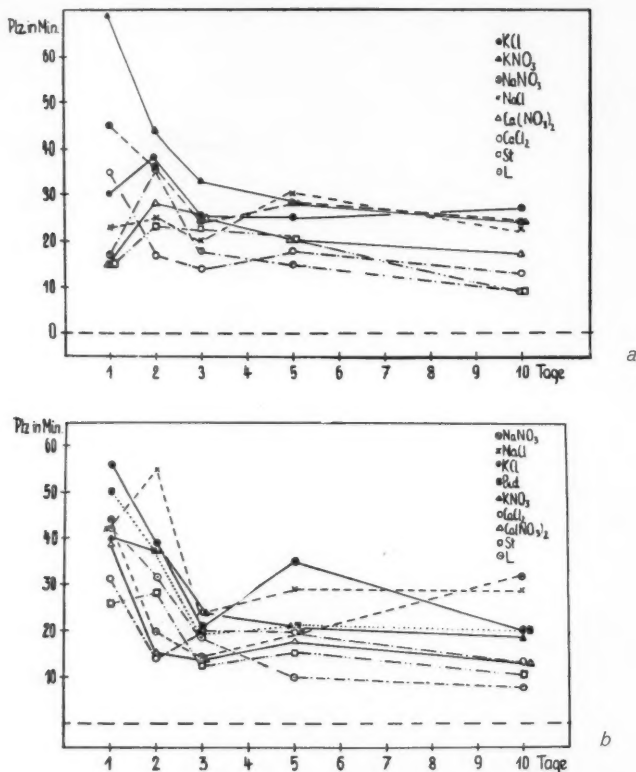


Abb. 6. Veränderungen der Plz ausgewachsener Blätter nach Vorbehandlung mit m/100 NaCl-,  $\text{NaNO}_3$ -, KCl-,  $\text{KNO}_3$ -,  $\text{CaCl}_2$ -,  $\text{Ca(NO}_3)_2$ -Lösung, Standortwasser und Leitungswasser in belichteten (a) und dunkel gehaltenen (b) Versuchsserien. Plasmolytikum mit relativem Hypertoniegrad.

wurden zum Vergleich auch die Nitrate von Na, K und Ca herangezogen, um zu prüfen, ob es sich bei den beschriebenen Veränderungen um spezifische KCl- bzw.  $\text{CaCl}_2$ -Wirkungen handelt oder ob auch  $\text{KNO}_3$ - bzw.  $\text{Ca(NO}_3)_2$ -Lösung in *Elodea*-Blättern gleiche Effekte hervorzurufen vermögen. In Abb. 6 a und b sind die Ergebnisse der Versuche mit m/100 Salzlösungen dargestellt. Wie schon bei den mit m/50 Salzlösungen behandelten Blättern bemerkt, war auch hier in den ersten Versuchstagen keine be-

stimmte Richtung der Veränderungen zu erkennen. Am dritten Versuchstag dagegen besteht schon ein deutlicher Unterschied zwischen KCl- und  $\text{KNO}_3$ -Blättern einerseits und  $\text{CaCl}_2$ -,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -, St- und L-Blättern andererseits. Die in K-Lösungen eingelegten Blätter zeichnen sich wieder durch besonders lange Plzen aus, die mit Ca-Lösungen, St und L behandelten durch kurze Plzen. Zwischen der durch Nitratlösungen oder durch Chloridlösungen bewirkten Verschiebung der Plzen bestehen keine nennenswerten Unterschiede.

Läßt man außer acht, ob Nitrat- oder Chloridlösungen angewendet wurden, ob die Versuche belichtet oder dunkel gehalten wurden, so ergeben sich für die in den verschiedenen Salzlösungen kultivierten Blätter folgende Plz-Werte:

Na-Salzlösungen	. .	30 Minuten
K-Salzlösungen	. . .	35 Minuten
Ca-Salzlösungen	. .	20 Minuten
Aq. bidest.	. . .	26 Minuten
Leitungswasser	}	. . 20 Minuten
Standortwasser		

Die Zahlen stellen Durchschnittswerte der Plzen dar, die bei zehntägiger Versuchsdauer für die verschiedenen Behandlungsarten ermittelt wurden. Das Ergebnis spricht eindeutig dafür, daß die mit Na- und K-Salzlösungen behandelten Blätter wesentlich längere Zeit bis zur Abrundung benötigen als mit Ca-Lösungen behandelte Blätter.

Ähnlich wie mit der Plz-Methode sind auch mit der Plf-Methode deutliche Unterschiede im Verhalten der Blätter nach der Behandlung mit Ein-salzlösungen festzustellen. Kurz nach dem Einlegen in das Plasmolytikum ist in den ersten Versuchstagen an mit KCl- und  $\text{KNO}_3$ -Lösungen behandelten Blättern Krampfplasmolyse zu beobachten, an mit Ca-Lösungen behandelten Blättern Konkavplasmolyse. Im folgenden soll der 5. Versuchstag herausgegriffen werden, um die Plf der verschieden behandelten Blätter vergleichend zu betrachten. In bezug auf die Plz sind am 5. Versuchstag schon deutlich zwei Gruppen zu unterscheiden:

1.  $\text{CaCl}_2$ -,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -, Leitungswasser- und Standortwasserblätter mit 15–20 Minuten Plz und

2. NaCl-,  $\text{NaNO}_3$ -, KCl-,  $\text{KNO}_3$ - und Aq. bidest.-Blätter mit 25–30 Minuten Plz.

Vergleicht man 10 Minuten nach Plasmolysebeginn die Plf, so stellt man fest, daß in den Blättern, die in KCl-Lösung eingelegt waren, die Protoplasten abgelöst, aber nicht vollständig gerundet sind, sondern konkave Eindellungen und lang ausgezogene Plasmafortsätze zeigen, die häufig durch Hechtsche Fäden mit den Zellwänden verbunden sind. In mit  $\text{KNO}_3$ -Lösungen behandelten Blättern ist ähnliche Plf zu beobachten. Die Plf der mit NaCl- und  $\text{NaNO}_3$ -Lösungen behandelten Blätter unterscheidet sich kaum von derjenigen, die mit K-Salzlösungen behandelte Blätter zeigen. Wie bei der Verwendung von KCl- oder  $\text{KNO}_3$ -Lösungen besteht auch bei

der Behandlung mit NaCl- oder  $\text{NaNO}_3$ -Lösungen kein wesentlicher Unterschied in der Plf der mit Nitrat- oder Chloridlösungen behandelten Blätter. Nach Einwirkung von  $\text{NaNO}_3$ -Lösung ist die Plf in den ersten Versuchstagen etwas stärker konkav.

Ein völlig anderes Bild bietet sich bei der Betrachtung mit Ca-Salzlösungen behandelter Blätter. Schon nach 10 Minuten Plasmolysedauer ist ein großer Teil der Zellen völlig konvex plasmolysiert. Es ist ein einheitlicher, konvexer Protoplast zu beobachten, von dem kaum Hechtsche Fäden ausgehen. Bei dunkel gehaltenen Versuchsserien ergibt sich das gleiche Bild. Die aus  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung entnommenen Blätter runden sich etwas später ab als die in  $\text{CaCl}_2$ -Lösung kultivierten. Die Plf der  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Blätter ist nach 10 Minuten erst an der Blattspitze konvex, an der Blattbasis sind häufig konkave Formen zu beobachten, die aber nie in lange Plasmafortsätze auslaufen und auch nicht in Hechtsche Fäden ausgezogen sind wie bei den mit K- und Na-Salzlösungen behandelten Blättern. Völlig zu gleichmäßigen konvexen Plasmolyseformen abgerundet sind die Protoplasten der mit Leitungswasser oder Standortwasser behandelten Blätter.

Die durch Aq. bidest. ohne Salzzusatz bewirkte Plf ist dagegen der durch K- oder Na-Lösungen bewirkten Plf sehr ähnlich. Es tritt Konkavplasmolyse ein und der Protoplast ist zu langen Plasmafortsätzen ausgezogen.

Diese Unterschiede in der Plf, die mit den Plz-Resultaten übereinstimmen, sind nicht nur nach 5 oder 10 Tagen Versuchsdauer in so ausgeprägter Form zu finden, wie aus der Abb. 6 für die Plz zu ersehen ist, sondern auch noch nach 15 Tagen. Bei Behandlung mit K- und Na-Salzlösungen ergibt sich 10 Minuten nach dem Einlegen ins Plasmolytikum etwa folgendes Bild: Der von der Zellwand weitgehend abgelöste Protoplast ist leicht konkav eingewölbt. Zu den antiklinen Zellwänden hin sind Plasmafortsätze ausgestreckt, die nur in wenige Hechtsche Fäden auslaufen. In 15 Tage mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösung behandelten Blättern sind die Protoplasten schon nach wenigen Minuten völlig abgerundet. Auch die mit  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung behandelten Blätter weisen nach 10 Minuten Plasmolyse konvexe Plf auf, die Protoplasten sind aber nicht so vollständig abgerundet wie bei  $\text{CaCl}_2$ -Behandlung. In Leitungswasser oder Standortwasser eingelegte Blätter plasmolisieren konvex, obwohl sie mit verhältnismäßig konzentriertem Plasmolytikum (1,03 mol. KCl- $\text{CaCl}_2$ -Lösung) behandelt werden müssen, da der OG dieser Gruppe besonders stark ansteigt. Schon 5 Minuten nach Plasmolysebeginn liegen die Protoplasten völlig abgerundet in der Mitte der Zelle.

Obwohl sich nach längerer Versuchsdauer die Plz allgemein stark verkürzt, bleiben Unterschiede in der Plf zwischen KCl-,  $\text{KNO}_3$ -, NaCl-,  $\text{NaNO}_3$ - und Aq. bidest.-Blättern einerseits und  $\text{CaCl}_2$ -,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -, Standortwasser- und Leitungswasser-Blättern andererseits bestehen.

Im allgemeinen plasmolisieren die dunkel gehaltenen Blätter konkaver als die hell gehaltenen, die Plz ist dementsprechend länger. Bei Plasmolyse mit gleich konzentriertem Plasmolytikum (0,75 mol.) ist hier ein Unterschied durchaus zu erwarten, da die osmotischen Werte der hell gehaltenen Ver-

suche stark ansteigen, die der dunkel gehaltenen nur sehr wenig. Das Plasmolytikum ist für die belichteten Serien bedeutend weniger hypertonic als für die dunkel gehaltenen, und demzufolge müssen sich die Protoplasten der hell gehaltenen Blätter eher abrunden als die der Dunkelvarianten. Wenn diese Unterschiede im Hypertoniegrad aber durch eine verschiedene Konzentration der Plasmolytika ausgeglichen werden, ist anzunehmen, daß es sich bei den so ermittelten Werten um reale Plasmaunterschiede handelt.

Bei Behandlung mit schwächer konzentrierten Salzlösungen, z. B. m/150, bleiben die charakteristischen Unterschiede bestehen (Abb. 7). Die beiden

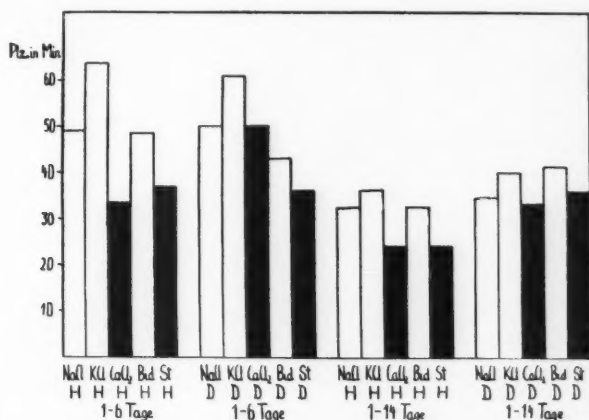


Abb. 7. Durchschnittliche Plz ausgewachsener Blätter nach Vorbehandlung mit m/150 NaCl-, KCl-, CaCl<sub>2</sub>-Lösung, Standortwasser und Aq. bidest. nach Plasmolyse in relativ hypertonischem KCl-CaCl<sub>2</sub>-Gemisch. H = hell, D = dunkel gehaltene Blätter.

ersten Diagramme stellen Durchschnittswerte der Plzen der ersten 6 Tage dar, die folgenden Durchschnittswerte 14tägiger Versuche. Während bei belichteten Versuchsserien schon aus dem Durchschnitt der ersten sechs Versuchstage klar zu ersehen ist, daß die in CaCl<sub>2</sub>-Lösung und Standortwasser kultivierten Blätter gegenüber KCl-Lösung und Aq. bidest. herabgesetzt sind, werden diese Unterschiede in dunkel gehaltenen Versuchen erst aus dem 14tägigen Durchschnitt deutlich. Nach Behandlung mit schwächer konzentrierten Salzlösungen ergeben sich also gleiche Verhältnisse wie bei Versuchen mit m/50 und m/100 Salzlösungen.

Abschließend soll noch kurz die Plf und Plz von Blättern, die mit Ba- und Mg-Lösungen behandelt wurden, erwähnt werden. Da sich in BaCl<sub>2</sub>-Lösung der OG verringert, ist 0,75 mol. KCl-CaCl<sub>2</sub>-Lösung schon ziemlich stark hypertonic und bewirkt unendlich lange Plz. Im angepaßten Plasmolytikum entspricht die Plz der wenigen überlebenden Zellen etwa der von Na-Salzlösungen. Nach Behandlung mit Ba(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Lösungen ist in den lebenden Zellen sehr schnelle

Abrundung des Protoplasten zu beobachten. Aus  $Mg(NO_3)_2$ -Lösungen entnommene Blätter fallen durch lange Plz auf. Basal ist häufig Krampfplasmolyse festzustellen, während an den Blattspitzen Schrumpfplasmolysen den Protoplasten irreversibel verändern, so daß eine Giftwirkung des  $Mg(NO_3)_2$  angenommen werden muß (vgl. Brenner 1920, Wischmann 1910 und Benecke 1907).

Alle bisher angeführten Bestimmungen der Plz und Plf wurden an Blättern durchgeführt, die im Dunkel- bzw. Lichtthermostaten mit Leuchtstoffröhrenbeleuchtung kultiviert wurden. In diesen Versuchsreihen konnte der Einfluß verschiedener Milieufaktoren auf das Plasma ermittelt werden. Der physikalische Faktor „Licht“ wirkte größtenteils verkürzend auf die Plz ein. Wesentlich deutlicher war dieser Einfluß des Lichtes in Versuchen zu beobachten, die dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt waren. Die Dunkelkontrollen wurden durch Dunkelstürze vor Lichteinfall geschützt.

Um ein Bild von den verschiedenen Plzen der basalen und apikalen Blatthälften zu vermitteln, sollen die Ergebnisse entsprechender Versuche in Form von Tabellen angeführt werden. In Tab. 1 sind die Werte des 3. Versuchstages angegeben.

Tab. 1. Plz ausgewachsener Blätter 3 Tage nach der Isolation und Behandlung mit Standortwasser (STH), Leitungswasser (LH) und Aq. bidest. (BH) in belichteten Versuchen, Standortwasser (STD), Leitungswasser (LD) und Aq. bidest. (BD) in dunkel gehaltenen Versuchen.

Plz 1 = in gleichkonzentriertem Plasmolytikum plasmolysiert. Plz 2 = Konzentration des Plasmolytikums dem OG relativ angepaßt. B = Blattbasis, Sp = Blattspitze, M = Mittelwert des Gesamtblattes. K = frisch vom Sproß abgetrenntes Kontrollblatt.

Behandlung	OG	Konz. 1 des Plasmolytikums	Plz 1			Konz. 2 des Plasmolytikums	Plz 2		
			B	Sp	M		B	Sp	M
STH . . . .	0,55	0,75	8	5	6	1,03	15	11	13
LH. . . . .	0,55	0,75	9	4	7	1,03	17	10	14
BH. . . . .	0,5	0,75	35	16	26	0,93	36	24	30
STD . . . .	0,45	0,75	20	15	18	0,84	38	28	33
LD. . . . .	0,5	0,75	17	13	15	0,93	32	24	28
BD. . . . .	0,45	0,75	27	19	23	0,84	49	20	35
K . . . . .	0,4	0,75	32	19	26	0,75	31	19	25

Die Protoplasten der in Standortwasser und Leitungswasser gehaltenen belichteten Blätter runden sich wesentlich schneller ab als die übrigen. Gegenüber dem Kontrollwert ist die Plz in gleichkonzentriertem Plasmolytikum auf ein Drittel abgesunken, in einem dem OG angepaßten Plasmolytikum auf die Hälfte. Entsprechend verhält sich die Plf. Schon nach 2 Minuten, bzw. in Konz. 2 nach 5 Minuten, sind einige Zellen der Spitzenhälfte völlig abgerundet, während die anderen wenig eingedellt und nur noch nach einer antiklinen Wand hin etwas zugespitzt sind. Ganz andere Plf weisen die in Aq. bidest. eingelegten belichteten Blätter auf. Das Plasma ist stark eingedellt und Hechtsche Fäden ziehen zu den Zellwänden, die Chloro-

plasten sind in Kernnähe stark gehäuft und in Form eines breiten grünen Bandes angeordnet, das sich quer durch die Zelle erstreckt. Die Protoplasten beginnen sich erst abzurunden, wenn die Kontrollblätter bereits konvex sind. Auch dann, wenn die Konvexform erreicht ist, unterscheiden sie sich von den belichteten Leitungswasserblättern dadurch, daß die Chloroplasten an einer periklinen Wand systrophiert sind. In Leitungs- und Standortwasser weisen die dunkel gehaltenen Blätter längere Plzen auf als in den Lichtversuchen.

Bis zum 7. Tag verkürzt sich die Plz der belichteten Leitungs- und Standortwasserblätter weiterhin. Die Plz-Werte der dunkel gehaltenen Blätter bleiben etwa konstant.

Tab. 2. *Plasmolysezeit ausgewachsener isolierter Blätter, die 7 Tage mit STH, LH, BH, STD, LD und BD behandelt wurden. Die Plf wurde 5 Minuten nach dem Einlegen ins Plasmolytikum festgestellt.*

O = Konvexplasmolyse, X = Konkavplasmolyse, K = Krampfplasmolyse. Sonstige Abkürzungen wie in Tab. 1.

Behandlung	OG	Konz. 1 d. Plasmolytikums	Plz 1			Konz. 2 d. Plasmolytikums	Plz 2			Plf 2	
			B	Sp	M		B	Sp	M	B	Sp
STH . . . .	0,55	0,75	7	4	5	1,03	14	10	12	X	X-O
LH. . . . .	0,6	0,75	4	2	3	1,12	10	9	10	X	X-O
BH. . . . .	0,55	0,75	19	11	15	1,03	55	31	43	K	X
STD . . . .	0,45	0,75	18	13	16	0,84	33	20	26	X	X
LD. . . . .	0,55	0,75	10	7	8	1,03	35	15	25	X	X
BD. . . . .	0,45	0,75	21	15	18	0,84	77	50	64	K	X
K . . . . .	0,4	0,75	30	21	26	0,75	30	21	26	K	X

In der zweiten Versuchswoche macht sich ganz allgemein eine Verkürzung der Plz bemerkbar. In der Tab. 3 sind die Plz- und Plf-Werte für 2 Wochen lang behandelte, isolierte Blätter angegeben.

Tab. 3. *Plasmolysezeit ausgewachsener isolierter Blätter, die 14 Tage mit STH, LH, BH, STD, LD und BD behandelt wurden.*

Abkürzungen wie in Tab. 1 und 2.

Behandlung	OG	Konz. 1 d. Plasmolytikums	Plz 1			Konz. 2 d. Plasmolytikums	Plz 2			Plf 2	
			B	Sp	M		B	Sp	M	B	Sp
STH . . . .	0,6	0,75	5	4	4	1,12	7	4	5	X	O
LH. . . . .	0,7	0,75	3	2	2	1,20	5	4	4	X	O
BH. . . . .	0,55	0,75	14	12	13	1,02	38	28	33	K	X
STD . . . .	0,45	0,75	8	4	6	0,84	15	8	11	X	X
LD. . . . .	0,55	0,75	5	3	4	1,02	6	2	4	X	O
BD. . . . .	0,45	0,75	21	14	18	0,84	41	19	35	K	X
K . . . . .	0,4	0,75	33	24	29	0,75	33	24	29	K	X

Im 0,75 mol. Plasmolytikum tritt bei allen Blättern verhältnismäßig schnell perfekte Plasmolyse ein. Verwendet man dem osmotischen Wert angepaßte Plasmolytika, so entsprechen Plz und Plf von mit Aq. bidest. behandelten Blättern etwa unbehandelten Kontrollblättern. Auffallend ist die sehr kurze Plz von STH- und STD-Blättern, die nur ein Fünftel bis ein Drittel des Wertes unbehandelter Blätter beträgt.

Bei den oben angeführten Versuchen machte sich die starke Veränderung des osmotischen Wertes störend bemerkbar. Wie aus den Versuchen zur Ermittlung des osmotischen Wertes ersehen werden kann, war es möglich, durch zweitägige Vorverdunklung der Blätter am Sproß den osmotischen Wert nach der Isolation fast konstant zu halten. Es erschien daher angebracht, die oben angegebenen Resultate mit den nach Vorverdunklung erhaltenen zu vergleichen.

Ganz allgemein werden in den ersten Versuchstagen längere Zeiten bis zur Konvexplasmolyse benötigt als in den Versuchsreihen ohne Vorverdunklung. Sehr stark verkrampfte Plf in der Basalzzone der Aq. bidest.-Versuche und besonders lange Plzen fallen in allen Versuchsreihen auf. In Aq. bidest. dauert es in einigen Blättern bis zu 5 Stunden, ehe sich alle Protoplasten abgerundet haben. Trotz der verlängerten Plf kommt deutlich zum Ausdruck, daß die Plz der LH- und LD-Blätter kürzer ist als die der BH- und BD-Blätter.

Nach 14 Tagen stimmen die Ergebnisse mit denen, die ohne Vorverdunklung erhalten wurden, fast völlig überein, so daß anzunehmen ist, daß die Verkürzung der Plz bei den mit Leitungswasser und Standortwasser behandelten Blättern gegenüber den in Aq. bidest. eingelegten ebenso wie die bei den Lichtversuchen gegenüber den Dunkelversuchen beobachtete nicht durch die Veränderung des OG verursacht wird.

#### b) Plasmolyseform (Plf) und Plasmolysezeit (Plz) isolierter junger wachsender Blätter

Parallel zu den Untersuchungen an ausgewachsenen Blättern wurden die Plzen junger wachsender Blätter bestimmt. Es hat sich als sehr ungünstig erwiesen, für die jungen wachsenden Blätter ebenfalls 0,75 mol. KCl-CaCl<sub>2</sub>-Lösung als Plasmolytikum zu verwenden, da sich die Plz dadurch zum Teil auf unendlich verlängert und diese Konzentration auch keineswegs dem osmotischen Wert entspricht. Beim Vergleich der Plz junger Blätter mit der alter Blätter in gleichkonzentriertem Plasmolytikum sind stets die Zeiten der jungen Blätter wesentlich länger. Zum Vergleich der jungen Blätter untereinander wurde als Plasmolytikum (Konz. 1) 0,48 mol. KCl-CaCl<sub>2</sub>-Lösung gewählt. Um auch dem osmotischen Gradienten innerhalb eines Blattes gerecht zu werden, wäre es erforderlich, jedes Blatt mit zwei bis drei verschieden konzentrierten Lösungen zu plasmolisieren, damit durch verschiedenen Hypertoniegrad vorgetäuschte Plz-Unterschiede vermieden werden. Ein Teil der Blätter wurde in 0,48 mol. KCl-CaCl<sub>2</sub>-Lösung (gegen 0,25 mol. Glucose-Lösung dreifach hypertonisch) eingelegt, andere

in 0,41 mol. KCl-CaCl<sub>2</sub>-Lösung (gegen 0,22 mol. Glucoselösung dreifach hypertonisch, was dem OG der Mittelzone von Blatt 1 und 2 entspricht).

Aus der Tab. 4 geht hervor, daß die plasmatischen Gradienten durch die geringen osmotischen Gradienten innerhalb des jungen *Elodea*-Blattes nur wenig beeinflusst werden. Im folgenden wurden daher die osmotischen Unterschiede innerhalb eines Blattes nicht durch verschiedene Konzen-

Tab. 4. Plasmolysezeit junger wachsender, frisch vom Sproß abgetrennter Blätter.

	Plasmolytikum	Plz in Stunden		
		Basis	Mitte	Spitze
Blatt 1 : 8 mm	0,41 mol.	9	2,75	2,5
	0,48 mol.	10	4	3,5
Blatt 2 : 14 mm	0,41 mol.	7	2,25	1
	0,48 mol.	9	2,75	1,25
Blatt 3 : 20 mm	0,41 mol.	2,25	1,5	0,75
	0,48 mol.	2,75	1,5	1

tration des Plasmolytikums berücksichtigt, sondern es wurde einheitlich mit 0,48 mol. KCl-CaCl<sub>2</sub>-Lösung plasmolysiert. Bei isolierten Blättern, deren OG sich im Laufe der Versuche veränderte, wurde das Plasmolytikum dem Durchschnitts-OG des Blattes angepaßt.

Den Plz-Zonen des Blattes entsprechend können auch drei Plf-Zonen am jungen *Elodea*-Blatt unterschieden werden. Die basale Zone von Blatt 1 und 2, das Meristem und die Streckungszone, plasmolysiert napfförmig (Borriß 1938) mit ausgeprägten Plasmolyseorten. Der Hauptteil des Plasmas ist auf die basale Zellhälfte beschränkt, von wo aus Plasmastränge und feine Hechtsche Fäden die apikale Zellhälfte durchziehen.

An der Blattbasis sind auf einer Strecke von 1–2 mm negative Plasmolyseorte zur Blattbasis hin zu beobachten, die in der Streckungszone plötzlich in der ganzen Breite des Blattes umschlagen. Nach Weber (1929 c) bezeichnet man als positiven Plasmolyseort die Stelle der Membran, an der sich der Plasmaschlauch abhebt, als negativen Plasmolyseort die Stelle, an der keine Abhebung erfolgt. Beim Plasmolyseeintritt heben sich in der meristematischen Zone zuerst die Protoplasten der basalen Zellen ab, es ist demnach anzunehmen, daß das Plasmolytikum von der basalen Schnittfläche her eindringt, was aber keineswegs die Ausbildung von positiven Plasmolyseorten zur Basis hin zur Folge hat, im Gegenteil, der Plasmaschlauch liegt gerade der basalen Zellwand an. Auf diese schmale plasmolysierte Zone folgt ein kleiner Blattbezirk, der 2–5 Minuten lang unverändert bleibt. Dieser unplasmolysierte Streifen engt sich vom Ende der Streckungszone und vom Blattrand her ein, von der Mittelrippe nur sehr wenig. Die negativen Plasmolyseorte treten in diesem Falle stets an der Zellwand auf, von der das Plasmolytikum eindringt. Es scheint also nicht immer so zu sein, daß sich der positive Plasmolyseort an der Stelle bildet, an der das Plasmolytikum zuerst in die Zelle eindringt (vgl. auch Strugger 1949). Nur wenn nekrotisch bedingte Herde in Form von abgestorbenen Zellen vorhanden sind, treten auch bei jungen *Elodea*-Blättern positive Plasmolyseorte zur Wundstelle hin auf.

Die Plf der Streckungszone ist basal napfförmig, apikal verkrampft. Die Krampfplasmolyse ist bis weit in die blaßgrün gefärbte, fast ausgewachsene Zone hinein zu verfolgen. Die ausgewachsene Spitzenzone plasmolysiert konkav. Das Auftreten derartiger Gradienten in jungen wachsenden Blättern veranlaßte Strugger (1934), weitgehende Schlüsse auf den Mechanismus des Streckungswachstums zu ziehen, die von verschiedenen Autoren nicht bestätigt werden konnten. Bei eingehenden Untersuchungen an *Elodea crispata* (Borriß 1938) ergab sich, daß an diesem Objekt gerade die Protoplasten der Zellen der Streckungszone schneller perfekt konvex

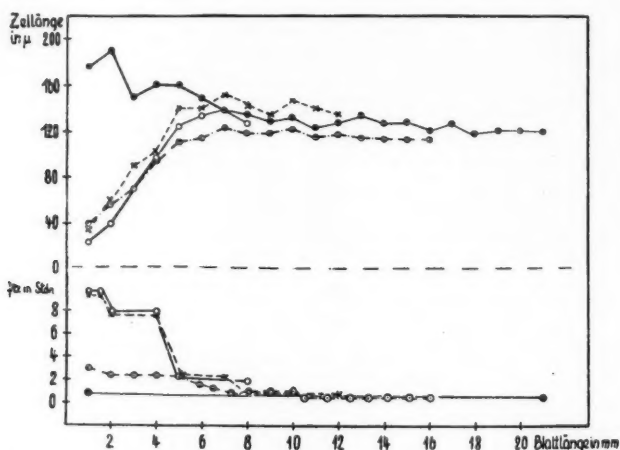


Abb. 8. Vergleich der Zelllängen und der Plz. Bezeichnungen wie in Abb. 1.

plasmolysieren als die ausgewachsenen Zellen. Ähnliche plasmatische Verhältnisse wurden an *Fontinalis antipyretica* gefunden (Borriß und Günther 1952). Ruge (1937) konnte an *Helianthus annuus*, einem der Strugger'schen Versuchsobjekte, zeigen, „daß die Steigerung der Plasmolysedauer zeitlich und somit auch entwicklungsphysiologisch dem Beginn des Streckungswachstums folgt, also nicht dessen Ursache darstellen kann.“ Pirson und Seidel (1950) stellten fest, daß bei *Lemna*-Wurzeln das Plz-Maximum in der bereits ausgewachsenen Zone liegt.

Vergleicht man die an jungen Blättern ermittelten Plz-Werte mit den entsprechenden Zelllängen (Abb. 8), so scheint der Kurvenverlauf auf einen Zusammenhang zwischen Wachstum und Plz hinzudeuten. Das Plz-Maximum liegt in der meristematischen Zone, mit zunehmender Zelllänge verkürzt sich die Plz. Bei der Beobachtung der Plf der verschiedenen Blattabschnitte könnte bei Hellfeldbeobachtung der Anschein erweckt werden, daß das Plasma der Zellen der blaßgrünen Zone viskoser sei als das der Zellen des Basalteils der Streckungszone. Während letztgenannte Zellen Napfplasmolyse zeigen, also eine der Konkavplasmolyse ähnliche Plf, plasmolysieren erstere krampfartig. Untersucht man aber die Napfplas-

molyse im Dunkelfeld (Abb. 9), so erkennt man, daß auch dabei stark zerklüftete, feine Plasmafortsätze auftreten, die in zahlreiche Hechtsche Fäden auslaufen.

Im folgenden soll wie bei ausgewachsenen Blättern der Einfluß von Licht, Dunkelheit, NaCl-,  $\text{NaNO}_3$ -, KCl-,  $\text{KNO}_3$ -,  $\text{CaCl}_2$ -,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung, Aq. bidest., Standortwasser und Leitungswasser auf junge wachsende Blätter geschildert werden. Zu den Versuchen wurden wie bei der Bestimmung des OG Blätter von drei verschiedenen Altersstufen untersucht: 8, 12 und 18 mm lange Blätter. Von jedem Blatt wurde die Plz und Plf der meriste-

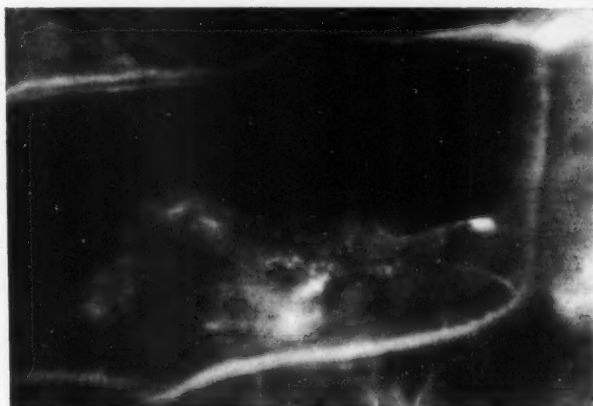


Abb. 9. Napfplasmolyse im basalen Teil der Streckungszone bei Dunkelfeldbeobachtung.

matischen Zone, der Streckungszone, der blaßgrünen Zone und der ausgewachsenen dunkelgrünen Spitze bestimmt.

Wenn man die Blätter von frisch dem Kulturbecken entnommenen Sprossen abtrennt, so ist, wie aus Tab. 4 zu ersehen, die meristematische Zone in einem 0,48 mol. Plasmolytikum nach etwa 10 Stunden konvex plasmolysiert, die Blattmitte nach 2—4 Stunden und die ausgewachsene Spitzenzone nach etwa 1—2 Stunden. Am 1. Versuchstag steigen die Werte für die meristematische und Streckungszone an, so daß die Zeit bis zum Abrunden des Protoplasten mehr als 10 Stunden beträgt, die Napfform der Plasmolyse bleibt im Meristem und in der basalen Streckungszone erhalten. Auch in der fast ausgewachsenen blaßgrünen Zone und in der ausgewachsenen Spitzenzone verändert sich die Plf nicht. Die Plz der blaßgrünen Zone beträgt etwa 4 Stunden, die der ausgewachsenen Zone 1—2 Stunden. Spezifische Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsweisen sind noch nicht festzustellen.

Am 2. Versuchstag verändert sich die Plf gegenüber unbehandelten Blättern nicht, die Plz dagegen ist etwas verkürzt. Nur bei wenigen Blät-

tern erfolgt nach 10stündiger Plasmolyse keine Abrundung. Besonders bei den kleinsten Blättern (8 mm) sind kürzere Zeiten von 4–6 Stunden zu beobachten. In der Streckungszone ist in hell gehaltenen Versuchsserien nur noch selten eine Plz von mehr als 10 Stunden zu verzeichnen, bei dunkel gehaltenen Blättern dagegen ist die Plz etwas länger. Durchschnittlich beträgt die Plz der Streckungszone etwa 6 Stunden. Außer dem eben erwähnten Licht- und Dunkeleffekt sind keine Einflüsse der verschiedenen Behandlungen zu bemerken. In der blaßgrünen Zone verkürzt sich die Zeit bis zur Abrundung der Protoplasten wesentlich. Während am 1. Versuchstag durchschnittlich 4 Stunden bis zur Abrundung benötigt wurden, ist die Plz jetzt auf 1–2 Stunden herabgesetzt. Für die ausgewachsene Zone ist die Plz ebenfalls verkürzt, wenn auch nicht auf die Hälfte wie in der blaßgrünen Zone. Bei der Plasmolyse der dunkel kultivierten Blätter wurden längere Zeiten bis zur perfekten Plasmolyse benötigt als bei den hell gehaltenen. In Leitungswasser und Standortwasser eingelegte Blätter weisen sowohl im Licht als auch im Dunkeln gegenüber den anderen Behandlungsarten verkürzte Plz auf.

Drei Tage nach Versuchsbeginn ist die für die verschiedenen Zonen charakteristische Plf immer noch erhalten: Napfplasmolyse in der meristematischen Zone, in der Streckungszone Napf- und Krampfplasmolyse, in der blaßgrünen Zone Konkavplasmolyse, in der ausgewachsenen Zone nur noch schwach konkave Formen. Die Plz des Meristems und der Streckungszone verändert sich gegenüber dem Vortag kaum, eine weitere Verkürzung ist aber für die blaßgrüne und die ausgewachsene Zone zu verzeichnen. Hell und dunkel gehaltene Blätter unterscheiden sich ganz deutlich, dagegen sind noch keine Differenzen zwischen den K- und Ca-Werten zu finden.

Erst nach 5 Versuchstagen können auch an jungen Blättern deutliche Unterschiede zwischen Na-, K- und Aq. bidest.-Behandlung einerseits und Ca-, Leitungswasser- und Standortwasserbehandlung andererseits festgestellt werden, wenn auch nur in der blaßgrünen und der ausgewachsenen Zone. Die Abhebung der Protoplasten erfolgt jetzt in der meristematischen Zone nur noch selten in Napfform, sondern wie in der Streckungszone in konkaver Form. Krampfplasmolysen sind nur noch gelegentlich zu beobachten.

Die Plasmolyseformen der verschieden behandelten Blätter unterscheiden sich in der Streckungszone kaum voneinander. Für die ausgewachsene und blaßgrüne Zone dagegen bestehen Unterschiede in der Plf, und zwar in dem Sinne, daß mit  $\text{CaCl}_2$ -,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung und Leitungswasser behandelte Blätter schon nach 30 Minuten Konvexplasmolyse aufweisen, mit  $\text{NaCl}$ -,  $\text{NaNO}_3$ -,  $\text{KCl}$ - und  $\text{KNO}_3$ -Lösung behandelte Blätter dagegen noch Konkavplasmolyse. Auffallend ist, daß in allen Blättern auch 5 Tage nach dem Abtrennen vom Sproß noch deutliche plasmatische Gradienten bestehen, indem die Streckungszone stark konkav bis krampfartig plasmolysiert, die ausgewachsene Zone dagegen konvex bis leicht konkav.

Erst in der zweiten Versuchswoche sinkt die Plz rapid ab. In hell gehaltenen Versuchen plasmolisieren die ausgewachsenen Zellen schon nach

10–20 Minuten konvex, die Zellen der Streckungszone nach 30–45 Minuten. Die dunkel gehaltenen Blätter weisen längere Plz auf. Für die ausgewachsenen Zellen betragen die Werte 30–60 Minuten, für die Zellen der Streckungszone 1–5 Stunden. Im Gegensatz zur 1. Versuchswoche sind nun auch Unterschiede in der Plf der Streckungszone zwischen den mit K-, Na-

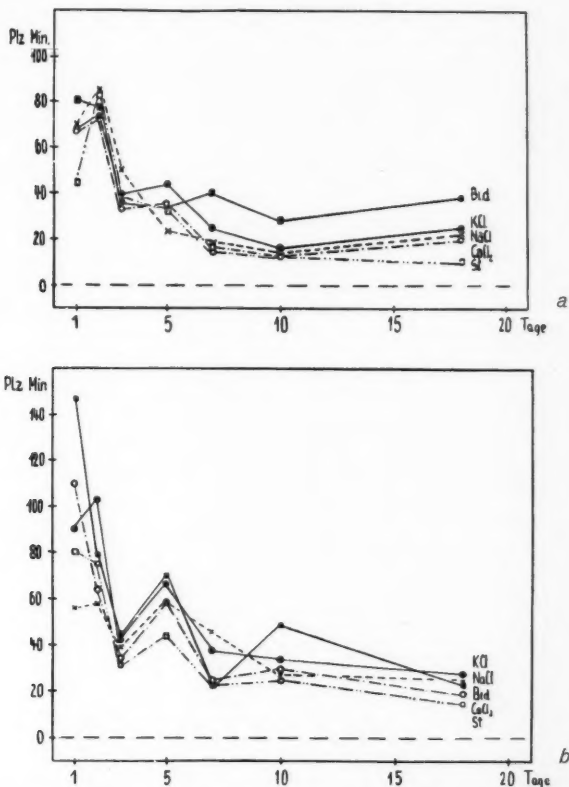


Abb. 10. Veränderungen der Plz der ausgewachsenen Zone junger wachsender Blätter nach Vorbehandlung mit NaCl-, KCl-, CaCl<sub>2</sub>-Lösung, Aq. bidest. und Standortwasser in belichteten (a) und dunkel gehaltenen (b) Versuchsserien.

Salzlösungen und mit Aq. bidest. behandelten Blättern einerseits und den mit Ca-Salzlösungen, Leitungswasser und Standortwasser behandelten Blättern andererseits festzustellen. Jetzt ist auch in der Wachstumszone die Plz der Na-, K- und Aq. bidest.-Gruppe länger als die der Ca-, Leitungswasser- und Standortwassergruppe. Bemerkenswert ist, daß noch nach so langer Versuchsdauer geringe Gradienten in der Plz und Plf zwischen Streckungs- und ausgewachsener Zone bestehen.

Wie die ausgewachsenen Blätter wurden auch die jungen wachsenden Blätter nicht nur mit m/100, sondern auch mit m/50 und m/150 Lösung behandelt. Da keine wesentlichen Abweichungen von den eben besprochenen

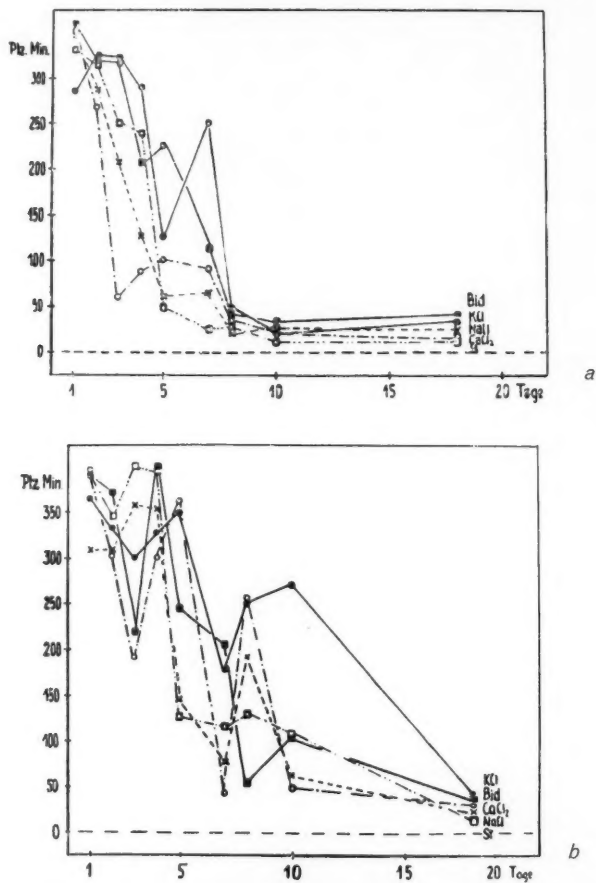


Abb. 11. Veränderungen der Plz der Streckungszone von jungen wachsenden Blättern nach Vorbehandlung mit Einsalzlösungen, Aq. bidest. und Standortwasser in belichteten (a) und dunkel gehaltenen (b) Versuchsserien.

Ergebnissen bestehen, möchte ich diese Versuchsreihen nicht gesondert beschreiben.

Da vor allem die Gegenüberstellung der plasmatischen Verhältnisse ausgewachsener und wachsender Zellen von Interesse ist, habe ich die Plz-Ergebnisse der ausgewachsenen Zone aller wachsenden Blätter in den Abb. 10 a und b dargestellt.

In der ausgewachsenen Spitzenzone der Blätter erfolgt im Laufe des Versuchs eine langsame Verkürzung der Plz, die sich bei hell gehaltenen Serien schneller vollzieht als bei dunkel gehaltenen. In belichteten Serien sind die Plzen schon nach 24 Stunden erheblich verkürzt und liegen nach 3 Tagen unter 40 Minuten, in den dunkel gehaltenen Versuchen dagegen werden in den ersten Tagen noch ziemlich lange Plzen gemessen, und in den folgenden Tagen schwanken die Werte etwa um 60 Minuten. Die Protoplasten der in KCl-Lösung und Aq. bidest. eingelegten Blätter benötigen längere Zeit bis zur Abrundung als mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösung oder Standortwasser behandelte.

In den Abb 11 a und b sind die Werte für die Plzen der Streckungszone eingetragen. Wie schon aus Abb. 10 für die ausgewachsenen Zellen zu ersehen war und wie für die ausgewachsenen Blätter allgemein gilt, wird auch in wachsenden Zellen durch das Licht die Plz verkürzt. Die im Versuchsverlauf allgemein beobachtete Tendenz des Protoplasmas, sich nach längerer Isolation der Blätter in kürzerer Zeit abzurunden, wirkt sich unter dem Einfluß des Lichtes schneller aus als im Dunkeln. Der Einfluß der Behandlung mit den verschiedenen Salzlösungen prägt sich in den wachsenden Zellen erst später in der Plz aus, was besonders bei den dunkel gehaltenen Blättern zu bemerken ist. Der Durchschnitt aus 10 Versuchsreihen ergibt, daß auch in der Streckungszone die mit KCl-Lösung und mit Aq. bidest. behandelten Blätter längere Plz aufweisen als in  $\text{CaCl}_2$ -Lösung und Standortwasser kultivierte Blätter. Die Verkürzung der Plz, die im Laufe des Versuches bei allen Behandlungen eintritt, setzt bei  $\text{CaCl}_2$ - und Standortwasserblättern schneller ein, während KCl-Lösung und Aq. bidest. das Plasma noch etwas länger in seinem normalen zähflüssigen Zustand erhalten.

#### B. Bestimmung der Zentrifugierungszeit

Das Prinzip der Zentrifugierungsmethode beruht auf der Verlagerung bestimmter Zellbestandteile durch die Zentrifugalkraft. Die Zeit, in der eine bestimmte Kraft einwirken muß, um die Teilchen zu verlagern, ist abhängig von der Viskosität der Protoplasmas.

Da die Plasmaviskosität nicht mit der Zähigkeit reinviskoser Flüssigkeiten übereinstimmt, fehlt es nicht an Stimmen, die eine Viskositätsbestimmung des Protoplasmas mit der Zentrifugierungsmethode ablehnen. Scarth (1927) weist ausdrücklich darauf hin, daß die Verlagerung von Körpern im Plasma kein Kriterium darstellt, um zwischen wahrer Viskosität und strukturellem Hindernis zu unterscheiden. Auch Frey-Wyssling (1948) sieht es als groben Fehler an, die Plasmaviskosität der Zähigkeit von Flüssigkeiten gleichzusetzen und den Widerstand des elastischen Molekulargerüsts zu vernachlässigen. Andere Autoren dagegen sind der Meinung, daß kurze Zentrifugierungszeiten bei schwachen Zentrifugalkräften ein richtiges Bild von der Viskosität vermitteln (Heilbrunn 1925, Kessler und Ruhland 1938, Schmidt, Diwald und Stocker 1940, Stälfelt 1946). Plasmolyseform- und Plasmolysezeit-Messungen von Weber (1929 d) an *Elodea canadensis* vor und nach kurzfristigem (30 Minuten) Zentrifugieren mit schwachen Umdrehungen (etwa 2000/Minute) stimmten völlig überein,

so daß anzunehmen ist, daß dieses Objekt keine Schädigungen durch die Zentrifugierung erleidet.

Ausführliche Besprechungen der Zentrifugierungsmethode liegen von Heilbrunn (1925, 1928), Ruge (1940) und Virgin (1951) vor, so daß an dieser Stelle auf eine eingehende Diskussion verzichtet werden kann. Dellingshausen (1936) hält die Zentrifugierungsmethode nur für anwendbar, wenn die zu vergleichenden Objekte in folgenden Punkten übereinstimmen:

1. Der Weg, der den Teilchen zur Verfügung steht, muß gleich sein (d. h. die Zellen müssen gleich lang sein).
2. Gleiches spezifisches Gewicht und gleiches Volumen der Teilchen.
3. Gleiche Lage in den Zellen.
4. Ungefähr gleiche Anzahl von Teilchen in den Zellen.

An *Elodea densa* kann man die Zähflüssigkeit des Plasmas feststellen, indem man die Verlagerungsfähigkeit der Chloroplasten im Cytoplasma mißt. Soweit es sich um den Vergleich ausgewachsener Blätter untereinander handelt, sind die Zellen als ungefähr gleich lang zu betrachten. In jungen Blättern dagegen haben die Chloroplasten einen kürzeren Weg zurückzulegen. Wenn dieser Faktor das Ergebnis wirklich entscheidend beeinflussen würde, müßte man beim Vergleich die alten Blätter schon als „verlagert“ angeben, wenn sich die Chloroplasten nur wenig verschoben haben. Es handelt sich bei den Werten für ausgewachsene Zellen und nicht ausgewachsene Zellen stets um größere Differenzen, so daß man Unterschiede im Weg, den die Teilchen zurückzulegen haben, vernachlässigen kann.

Schwieriger ist es, Teilchen von gleicher Größe und gleichem spezifischen Gewicht zu verwenden. Das Volumen der Chloroplasten wurde nach Längenmessungen geschätzt, wobei starke Veränderungen im Laufe des Versuchs festgestellt wurden, die nicht ohne Einfluß auf die Ergebnisse blieben. Da diese Veränderungen in allen Versuchsserien etwa gleichsinnig verliefen, wird ein Vergleich der verschieden behandelten Blätter dennoch möglich sein. Das spezifische Gewicht der Chloroplasten ist vom Stärkegehalt abhängig. Es war daher nötig, parallel zu den Zentrifugierungsversuchen die Bestimmung des Stärkegehaltes durchzuführen. Veränderungen im Stärkegehalt fanden bei der Auswertung der Versuche Berücksichtigung.

Die zu untersuchenden Blätter kamen zum Zentrifugieren zwischen zwei für die Zentrifugengläschen passend zurechtgeschnittene Objektträger, die durch ein Gummiband zusammengehalten wurden, um eine Verschiebung der Blätter zu verhindern. Die Zentrifugengläschen wurden mit den entsprechenden Salzlösungen, Leitungswasser oder Aq. bidest. beschickt. Nach Vorversuchen mit höheren Geschwindigkeiten hat es sich als günstig erwiesen, eine Umdrehungszahl von 2000 in der Minute anzuwenden.

#### a) Zentrifugenzeit normaler unbehandelter Blätter

Bevor ich mich den Zentrifugierungsversuchen mit behandelten Blättern zuwende, sollen einleitend die an normalen, frisch vom Sproß abgetrennten Blättern gewonnenen Ergebnisse besprochen werden.

Von Moder (1932) liegen Versuche über ausgewachsene Blätter vor. Bei einer Tourenzahl von 2600 Umdrehungen/Minute verlagerten sich nach einer Minute die

Chloroplasten der Zellen der Blattbasis und der Mittelrippe, die der übrigen Zellen erst später. Eigene Versuche konnten bestätigen, daß die Chloroplasten der Mittelrippen- und Basalzellen stets zuerst verschoben waren. Frühzeitige Chloroplastenbewegung kurz unterhalb der Spitze (Esterak 1935) wurden nur vereinzelt beobachtet. Daten über Verlagerungszeiten aller erkennbaren Plasmaeinschlüsse in jungen Blättern gibt Ruge (1940) an, der selbst nach 30 Minuten bei 2000 Umdrehungen in den jüngsten Stadien keine Umlagerung erzielen konnte. Die für die weiter entwickelten Stadien angegebene Kurve ähnelt in ihrem Verlauf unserer für 16 mm lange *Elodea*-Blätter ermittelten Kurve.

Durch eingehende Zentrifugierungsversuche konnte Stälfelt (1946) feststellen, daß die bei *Elodea*-Blättern mit der Zz-Methode gemessenen Viskositätswerte

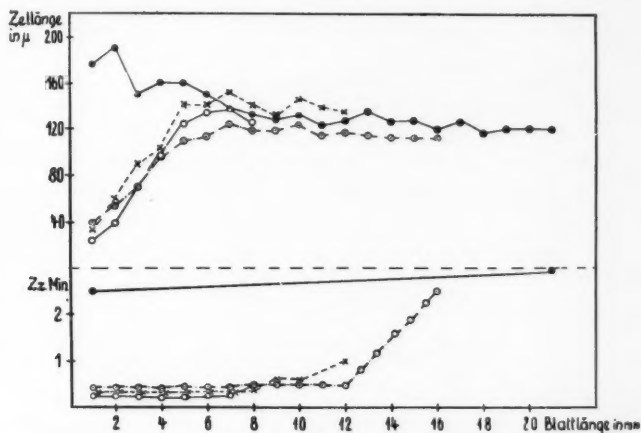


Abb. 12. Vergleich der Gradienten der Zelllänge und der Zz. Bezeichnungen siehe Abb. 1.

im Laufe des Tages in bestimmtem Rhythmus schwankten (vgl. auch Weber 1925). Gleichbleibende Ergebnisse waren erst zu erzielen, wenn die Blätter drei Tage lang dunkel gehalten wurden. Kurzfristige Lichtblitze wirkten sich sofort wieder in Veränderungen der Viskosität aus. Diese Resultate konnten von Virgin (1948, 1951, 1952) bestätigt werden, der auch an anderen Objekten ähnliche Beziehungen feststellte (1949 b).

Bei ausgewachsenen Blättern betrug in eigenen Versuchen die Zz bei 1500 Umdrehungen 2,5–4 Minuten, die Chloroplasten der Mittelrippenzellen verlagerten sich stets schon nach 2 Minuten.

Die Zz-Werte junger Blätter stehen im krassen Gegensatz zu den Plf- und Plz-Befunden. Während man nach den Plasmolyseversuchen auf höhere Viskosität der jungen Blätter schließen konnte, ist aus der Zz das Gegenteil zu entnehmen. In Abb. 12 sind die Zzen und die entsprechenden Zelllängen aufgeführt. Im kleinsten Blatt waren sowohl im Meristem als auch in der Streckungszone die Chloroplasten schon nach 20 Sekunden völlig verlagert, nach 30 Sekunden auch die Chloroplasten der Blattspitze. Im mittelhohen Blatt dauerte es im Meristem und in der Streckungszone 30 Sekunden und

in der Spitze 1 Minute, bis die Chloroplasten in die zentrifugale Zellhälfte geschleudert waren. Im größten Blatt fanden sich nach 30 Sekunden nur die Chloroplasten der basalen Streckungszone zentrifugal verlagert. Um die Chloroplasten der Blattmitte zu verschieben, mußte eine Minute zentrifugiert werden, für die Chloroplasten der Blattspitze  $2\frac{1}{2}$  Minuten. Diese Werte wurden mit nur sehr geringen Differenzen zu jeder Tageszeit gefunden. Auch Virgin (1951) konnte bei seinen Zentrifugierungsversuchen an jungen *Elodea*-Blättern kürzere Zeiten als bei älteren messen.

Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß durch das Licht bedingte Viskositätschwankungen die Versuchsergebnisse beeinträchtigen, wurden eine Woche lang während des Tages alle 2 Stunden Messungen der Verlagerungszeiten durchgeführt. Dabei kam ich zu den in der Tabelle 5 angegebenen Werten:

Tabelle 5

Zeit	Ausgewachsene Blätter		Junge Blätter			
	Blattoberseite	Blattunterseite	Blattoberseite		Blattunterseite	
			Basis	Spitze	Basis	Spitze
7 <sup>00</sup>	2,5 Min.	7 Min.	30 Sek.	3,0 Min.	45 Sek.	7,0 Min.
9 <sup>00</sup>	3,0 Min.	8 Min.	30 Sek.	4,0 Min.	45 Sek.	8,0 Min.
11 <sup>00</sup>	3,5 Min.	8 Min.	30 Sek.	4,0 Min.	45 Sek.	8,5 Min.
13 <sup>00</sup>	3,0 Min.	8 Min.	30 Sek.	3,5 Min.	30 Sek.	5,5 Min.
15 <sup>00</sup>	3,0 Min.	9 Min.	30 Sek.	3,0 Min.	30 Sek.	4,5 Min.
17 <sup>00</sup>	2,5 Min.	7 Min.	20 Sek.	2,5 Min.	30 Sek.	3,0 Min.
19 <sup>00</sup>	2,5 Min.	6 Min.	20 Sek.	2,5 Min.	30 Sek.	4,0 Min.

Aus Tab. 5 ist zu ersehen, daß mit Ausnahme der sonst zu den Versuchen nicht verwendeten Blattunterseite nur geringe tägliche Schwankungen an den Versuchsblättern festzustellen sind. Im allgemeinen sind morgens kurze Zzen zur Verlagerung der Chloroplasten nötig, im Laufe des Vormittags erfolgt ein Anstieg, nachmittags stimmen die Zeiten wieder mit den morgens gemessenen Zz-Werten überein. In den folgenden Versuchen ist kaum mit Versuchsfehlern zu rechnen, die durch eine autonome Rhythmik bedingt sind, da die an isolierten Blättern beobachteten Zz-Veränderungen wesentlich größer sind. Außerdem wurde der größte Teil der Versuchsblätter ständig belichtet bzw. völlig dunkel gehalten, so daß nach wenigen Tagen jede Rhythmik ausgeschaltet sein mußte.

#### b) Zentrifugenzeiten von ausgewachsenen behandelten Blättern

Wie bei den Plasmolyseversuchen ergaben sich auch bei der Messung der Zz Unterschiede bei verschiedener Behandlung der Blätter. Aus Abb. 13 sind die Zz-Werte bei 1500 Umdrehungen/Minute im Laufe von 4 Versuchswochen bei Vorbehandlung mit Leitungswasser und Aq. bidest. zu ersehen.

In den ersten 3 Tagen nach der Isolation entsprechen die Verlagerungszeiten etwa denen normaler Blätter. Allein die Chloroplasten der dunkel gehaltenen Blätter sind etwas schwerer zu verlagern. Erst gegen Ende der 1. Woche ist sowohl bei den belichteten als auch bei den dunkel gehaltenen Blättern ein stärkerer Anstieg der Zz auf das Zwei- bis Dreifache gegen-

über der Zz normaler Blätter zu bemerken. Nach weiteren 8 Tagen wird die schlechte Verlagerungsfähigkeit der Chloroplasten in dunkel gehaltenen Zellen immer deutlicher, und nach dreiwöchiger Dunkelbehandlung hat sich die Zz verfünffacht. Nach 5 Wochen kann keine Veränderung der Chloroplastenlage mehr erreicht werden. Unterschiede bestehen nur zwischen hell und dunkel gehaltenen Versuchen, die Behandlung mit Leitungswasser oder Aq. bidest. wirkt sich kaum auf die Zz aus.

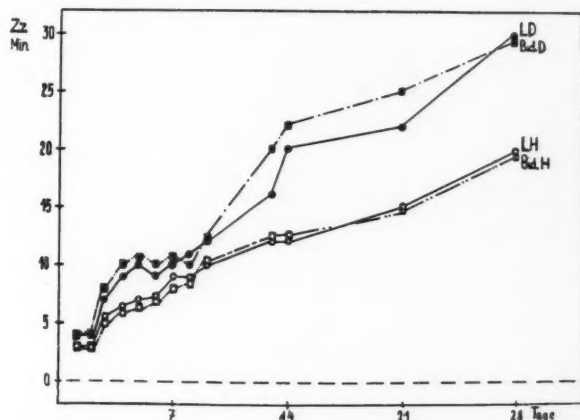


Abb. 13. Veränderungen der Zz ausgewachsener Blätter nach Vorbehandlung mit Leitungswasser und Aq. bidest., belichtet und dunkel gehalten.

Wieweit haben Stärkegehalt und Chloroplastengröße Einfluß auf diese Ergebnisse?

Über die Verteilung des Stärkegehaltes im normalen *Elodea*-Blatt macht Moder (1932) genaue Angaben, die wir durch eigene Versuche bestätigen konnten. Danach sind die basalen und Mittelrippenzellen am stärkereichsten, zur Spitze hin nimmt der Stärkegehalt ab. Die Bestimmung erfolgte, wie bei Moder angegeben, durch Einlegen ganzer Blätter in Jod-Chloralhydrat. Vergleicht man nun Zz und Stärkegehalt, so ergibt sich, daß die äußersten Basal- und Mittelrippenzellen, die am stärkereichsten sind, kürzere Zz aufweisen als die übrigen Laminazellen. Deshalb wurden bei den vergleichenden Untersuchungen auch stets nur die Feldzellen berücksichtigt. Stärkekontrollen der behandelten Blätter zeigten gleichsinniges Verhalten aller Versuchsreihen. Schon nach 3 Tagen sind die Feldzellen stärkefrei, und nur die Mittelrippenzellen und wenige benachbarte Zellreihen (nebst einer schmalen basalen Zone) färben sich beim Stärkenachweis kräftig blau. Der verschiedene Stärkegehalt kann demnach nur in den ersten drei Tagen einen Einfluß auf die Verlagerungszeiten ausüben, da in der Folgezeit alle Feldzellen gleichmäßig stärkefrei sind.

Anders ist es mit der Chloroplastengröße. Die Chloroplasten der behandelten Blätter werden im Versuchsverlauf sehr viel kleiner. Zu Beginn des Versuchs beträgt die Chloroplastengröße basal  $6-7\mu$  und nimmt zur Blattspitze auf  $5\mu$  ab. In der ersten Versuchswoche verändern sich die

Chloroplasten kaum, nach 7 Tagen werden an der Basis immer noch  $6\mu$  für die Chloroplastenlänge gemessen, an der Blattspitze etwas kleinere Werte

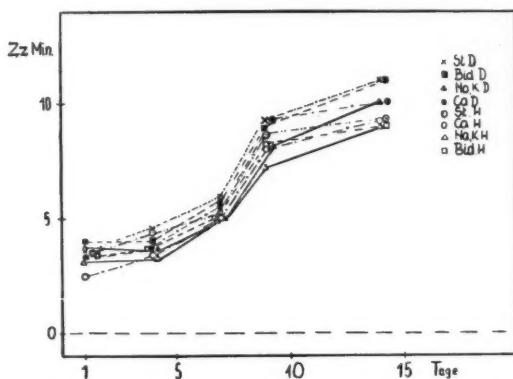


Abb. 14. Veränderungen der Zz ausgewachsener Blätter nach Vorbehandlung mit Einsalzlösungen, Aq. bidest., Leitungswasser und Standortwasser bei Sommerversuchen.

( $4\mu$ ). Nach der 2. Versuchswoche sind die Chloroplasten an der Blattbasis nur noch  $4-5\mu$  groß, nach 3 Wochen nur noch  $2,5-3,5\mu$ .

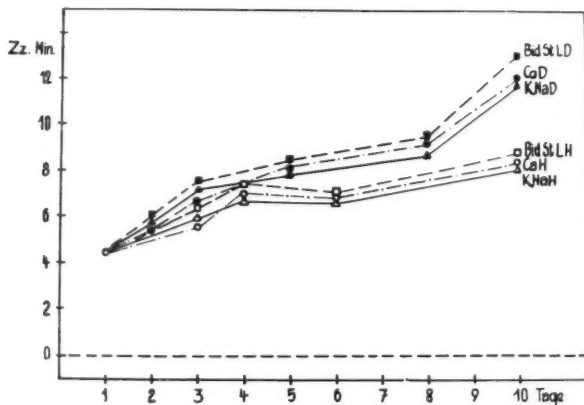


Abb. 15. Veränderungen der Zz ausgewachsener Blätter nach Vorbehandlung mit Einsalzlösungen, Aq. bidest., Standortwasser und Leitungswasser bei Winterversuchen.

Alle Faktoren, die die Zentrifugierungsversuche störend beeinflussen könnten, verändern sich also bei den verschiedenen Behandlungen gleichsinnig, so daß man die Resultate als vergleichbar betrachten kann. Die Ver-

suche haben ergeben, daß die Chloroplasten der mit  $\text{NaCl}$ -,  $\text{NaNO}_3$ -,  $\text{KCl}$ - und  $\text{KNO}_3$ -Lösungen behandelten Blätter etwa die gleiche Zeit zur Verlagerung benötigen. Nach Behandlung mit diesen vier Salzlösungen konnte die kürzeste Zz gemessen werden. Die Chloroplasten der mit  $\text{CaCl}_2$ - und  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung behandelten Blätter verlagern sich  $\frac{1}{2}$ –1 Minute später, und die in Leitungswasser, Standortwasser und Aq. bidest. kultivierten Blätter weisen die längste Zz auf, unterscheiden sich aber im Gegensatz zu dem Verhalten bei den Plz-Versuchen nicht untereinander. Wie schon bei den Versuchen mit Leitungswasser und Aq. bidest. angeführt war, müssen die Chloroplasten der dunkel gehaltenen Blätter länger zentrifugiert werden, um eine Verlagerung zu bewirken.

Die im Laufe von 10 Tagen beobachteten Veränderungen geben die Abb. 14 und 15 an. Beiden Abbildungen gemeinsam ist der langsame Anstieg der Zz im Versuchsverlauf. In der Sommerkurve (Abb. 14) entspricht die Zz in den ersten Versuchstagen den Werten unbehandelter normaler Blätter. Bei Winterversuchen dagegen muß schon in den ersten Versuchstagen länger zentrifugiert werden, um die Chloroplasten zu verlagern. Da  $\text{NaCl}$ -,  $\text{NaNO}_3$ -,  $\text{KCl}$ - und  $\text{KNO}_3$ -Lösungen gleichsinnig auf die Zz einwirken, wurden die entsprechenden Werte zu einer Kurve zusammengefaßt. Ebenso wurde für Leitungswasser, Standortwasser und Aq. bidest. nur eine Kurve eingetragen.

Die Zz-Kurven dieser drei Gruppen liegen eng beieinander. Der Einfluß des Milieus wirkt sich also nur wenig auf die Zz aus. Dem Licht kommt dagegen eine wesentliche Bedeutung zu. Die Chloroplasten belichteter Blätter sind stets nach kürzerer Zeit verlagert als die Chloroplasten der dunkel gehaltenen Blätter.

#### *c) Zentrifugierungszeiten junger wachsender Blätter*

Wie schon mitgeteilt, unterscheidet sich die Zz junger wachsender Blätter ganz wesentlich von der Zz ausgewachsener Blätter: Sie beträgt etwa nur 20% der letzten. Nach der Isolation verändert sich auch bei jungen wachsenden Blättern die Zz, indem im Laufe des Versuchs immer längere Zeiten nötig sind, um die Chloroplasten zur Verlagerung zu bringen. In den ersten 5 Versuchstagen bleiben die charakteristischen Gradienten zwischen Streckungs- und Dauerzone erhalten. Durch die verschiedene Behandlung der Blätter werden die Zz-Resultate der jungen Blätter noch weniger beeinflusst als die ausgewachsener Blätter. Die Chloroplastengröße in den Wachstumszonen beträgt 4–5  $\mu$ , 10 Tage nach der Isolation 3–4  $\mu$ , ändert sich also im Laufe des Versuchs nur wenig.

### **IV. Veränderungen der Chloroplasten und der Blattfarbe**

Neben den Veränderungen des osmotischen und protoplasmatischen Zustandes ändert sich makroskopisch sichtbar die Farbe und Beschaffenheit der Blätter und mikroskopisch nachweisbar die Anordnung der Chloroplasten.

Am Sproß sind alle Blätter frisch grün und mit der Spitze leicht nach unten gewölbt. Die Chloroplasten sind den Protoplasmasträngen folgend über die Zelle verteilt. Der der Wand anliegende Plasmaschlauch ist ebenfalls reich an Chloroplasten, die aber kaum gehäuft, sondern weitgehend verteilt liegen. Allein um den Kern herum, der meist als helle Blase deutlich sichtbar ist, befinden sich mehrere Chloroplasten.

Schon nach einem Tage ändert sich dieses vielsträngige Plasmagefüge. In aus Aq. bidest. hell entnommenen Blättern ballen sich die Chloroplasten so stark zusammen, daß nur noch ein dichtes dunkelgrünes Knäuel, das den Zellkern in sich verbirgt, aus der sonst transparenten Zelle aufleuchtet. In den dunkel gehaltenen Blättern entspricht die Chloroplastenanordnung zu meist noch der normaler Blätter.

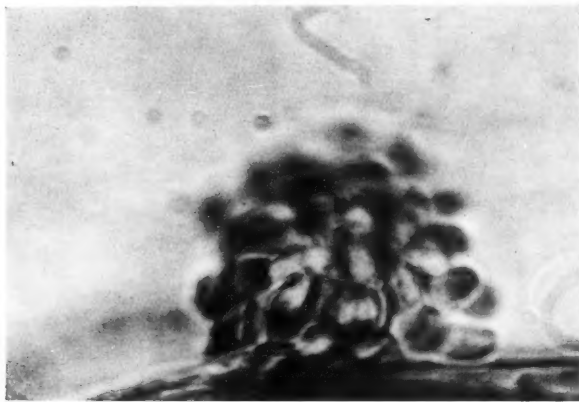


Abb. 16. Rotierende Systrophe in einem 3 Tage mit Standortwasser vorbehandelten Blatt, 30 Minuten mit 0,4 mol. Glucose plasmolysiert.

Am 2. Versuchstag besitzen alle Blätter wie am Sproß frischgrüne Farbe und zeigen äußerlich keine Veränderungen, nur die Anordnung der Chloroplasten weist kleine Unterschiede gegenüber der des Vortages auf. Die Chloroplastensystrophe der mit Aq. bidest. behandelten Blätter in belichteten Versuchen prägt sich noch stärker aus. Die Chloroplastenknäuel liegen wie Halbkugeln den periklinen Zellwänden an, und zwar häufig da, wo die antiklinen Zellwände angrenzen. Ähnliche Systrophen sind auch in Blättern, die mit  $\text{NaCl}$ -,  $\text{NaNO}_3$ -Lösung behandelt wurden, und vereinzelt auch in  $\text{KCl}$ - und  $\text{KNO}_3$ -Blättern zu beobachten.

Die Chloroplasten der in Leitungswasser,  $\text{CaCl}_2$ - und  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung kultivierten belichteten Blätter sind nicht mehr in der Zellmitte zentriert wie am ersten Tag, sondern ziehen als breiter Strang schräg durch die Zelle von einer periklinen Wand zur anderen. Die Chloroplasten der „Dunkelblätter“ haben inzwischen in allen Lösungen typische Dunkelstellung (Apostrophe) angenommen.

In den folgenden Tagen kann bei der Bestimmung der Grenzplasmolyse oft die von Küster (1910, 1929) als „rotierende Systrophe“ beschriebene Bewegung der Chloroplasten beobachtet werden. An einem Pol des abgehobenen Protoplasten gehäuft, rotiert das ganze Chloroplastenbündel (Abb. 16).

Von der zweiten Versuchswoche ab bis zum Absterben der Blätter, das 3–4 Wochen nach der Isolation beginnt, liegen die Chloroplasten der belichteten Blätter in Parastrophe, die der dunkel gehaltenen in Apostrophe. Der Absterbevorgang beginnt entweder von der Blattspitze oder von der Blattbasis aus, zumeist sind auch die Blattränder stark beschädigt. In der Nähe der Mittelrippe sind die Zellen am längsten lebensfähig. Die Chloroplasten verfärben sich in den belichteten Versuchen gelblich, in dunkel gehaltenen gelbbraun, ein Zeichen dafür, daß Chlorophyll abgebaut wird, die Carotinoide aber erhalten bleiben.

Ähnliche Veränderungen gehen an den jungen Blättern vor sich. Trennt man die Blätter ab, so kann man schon makroskopisch die blaßgrüne Wachstumszone von der ausgewachsenen kräftig grünen Spitze unterscheiden. Die Chloroplasten der Basalzone liegen über die ganze Zelle verteilt, die der Streckungszone dagegen auf wenige Stellen konzentriert, die der ausgewachsenen Spitze sind wie im ausgewachsenen Blatt gelagert. Das Meristem stirbt nach der Isolation bald ab, die Chloroplasten der Streckungszone und Spitze sind in Lichtversuchen vom 2.–5. Versuchstag leicht systrophiert, zum Teil ungeordnet über die Zelle verteilt. Die Chloroplasten der Dunkelblätter befinden sich in Apostrophe. Innerhalb der ersten 14 Tage verändert sich die Chloroplastenlage der dunkel gehaltenen Blätter nicht mehr, bei den belichteten tritt allgemein Parastrophe ein. In allen hell gehaltenen Blättern verschwinden die farblosen Zonen fast völlig, so daß das ganze Blatt fast gleichmäßig grün gefärbt ist. Die Dunkelblätter dagegen verblassen mehr und mehr. Junge Blätter sind nach der Isolation weniger resistent als alte Blätter. Besonders die jüngsten Blätter zeigen schon nach 8 Tagen Schädigungen.

## V. Besprechung der Ergebnisse

Zustandsänderungen der Plasmakolloide finden zu einem wesentlichen Teil Ausdruck in Verschiebungen der Plasmaviskosität. Den bisher bekannten Methoden zu ihrer Messung haften zahlreiche Fehlermöglichkeiten an, so daß nur bei äußerst kritischer Beurteilung der Ergebnisse auf die Zähigkeit geschlossen werden kann. Auf Grund der vorliegenden Resultate erscheint es sehr zweifelhaft, ob man aus den mit einer Methode gewonnenen Werten überhaupt auf die Konsistenz des Gesamtplasmas schließen darf.

Bei Durchsicht der Literatur begegnet man nicht selten Arbeiten, in denen die Plz- und Plf-Methode neben der Zentrifugierungsmethode angewendet worden ist. Die Mehrzahl der Autoren (Weber 1924, 1925, Weis 1926, Moder 1932, Esterak 1935, Prud'homme van Reine 1935, v. Dellinghausen 1936, Kessler und Ruhland 1938, Schmidt, Diwald und Stocker 1940, zum Teil Ruge 1940) gibt an, daß die mit

den beiden Methoden gewonnenen Resultate übereinstimmen. Sehr spärlich sind die Arbeiten mit abweichenden Resultaten (z. B. Kessler 1935, für *Hedera helix* und *Saxifraga cordifolia*). Fischer (1948) gibt an, daß er in Zentrifugierungsversuchen keine bestimmte Richtung hinsichtlich der Viskositätsänderungen feststellen konnte.

Wenn man berücksichtigt, daß die Plasmolysemethode im wesentlichen einen Einblick in die Beschaffenheit des Ektoplasmas vermittelt, die Zentrifugierungsmethode aber hauptsächlich die Verhältnisse im Binnenplasma widerspiegelt, wird man nicht unbedingt eine Übereinstimmung zwischen den nach beiden Methoden gewonnenen Resultaten erwarten. Im Gegenteil, es ist wahrscheinlich, daß Ekto- und Endoplasma von verschiedener Konsistenz sind.

Vergleichende Plasmolyse- und Zentrifugierungsmessungen an *Elodea* liegen bereits von anderen Autoren vor, und zwar für ausgewachsene Blätter von *Elodea canadensis* von Moder (1932) und Esterak (1935). Beide konnten Übereinstimmung zwischen den mit beiden Methoden gewonnenen Werten feststellen, fanden aber gerade entgegengesetzte Gradienten. Moder beobachtete in Harnstofflösung die ersten perfekten Plasmolysen an der Basis und ein Fortschreiten zur Spitze. Die ersten Chloroplastenverlagerungen fanden bei ihren Zentrifugierungsversuchen ebenfalls an der Basis statt. Esterak dagegen bemerkte die ersten Konvexplasmolysen kurz unterhalb der Spitze und beschrieb parallel dazu auch die kürzesten Zentrifugierungszeiten für die Spitze. Die eigenen Ergebnisse an *Elodea densa* zeigten die dritte Möglichkeit: Plz und Zz verhielten sich verschieden, die ersten Konvexplasmolysen konnten an der Spitze beobachtet werden (wie bei Esterak), die ersten Chloroplastenverlagerungen dagegen an der Blattbasis (wie bei Moder). Die Abweichung von den Resultaten Moders ist wahrscheinlich durch das Plasmolytikum bedingt. Da Moder Harnstoff verwendete, sind die kurzen Plzen an der Basis durch die höhere Permeabilität dieses Zellteils verursacht. In ausgewachsenen, normalen *Elodea*-Blättern unterscheiden sich demnach Ekto- und Endoplasma in ihrer Viskosität. Wenn die Zähigkeit des Plasmas durch den Hydratationsgrad der Plasmakolloide bestimmt wird, so werden die Faktoren, von denen die Quellung abhängt, auf die Konsistenz einwirken. Quellungssteuernde Bedeutung schreibt man vor allem den Kalium- und Calcium-Ionen zu. Man wird also erwarten können, daß das Vorhandensein dieser Ionen in der Kulturflüssigkeit sich auf die Viskosität auswirkt. Wie schon einleitend erwähnt, liegen auf diesem Gebiet bereits zahlreiche Arbeiten vor, deren Ergebnisse aber bisher keine Aufstellung einer allgemeingültigen Theorie der Ionenwirkung erlauben. Diese Widersprüche sind teilweise dadurch bedingt, daß die mit den verschiedenen Methoden der Viskositätsbestimmung gewonnenen Resultate direkt verglichen wurden. Es sollen hier nur die mit der Zz- und mit der Plf- und Plz-Methode bestimmten Werte diskutiert werden. Sicherlich sind bei unbehandelten *Elodea*-Blättern Ekto- und Endoplasma von verschiedener Konsistenz. Die Untersuchungen haben weiterhin ergeben, daß Ekto- und Endoplasma ganz verschieden auf Ein-

salzlösungen der hier verwendeten Konzentrationen ansprechen. In allen Versuchsserien waren in bezug auf Plz und Plf deutlich zwei Gruppen zu unterscheiden: Vorbehandlung mit  $\text{CaCl}_2$ -,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung, Standortwasser und Leitungswasser hatte kurze Plz und wenig konkave Plf zur Folge, Vorbehandlung mit  $\text{NaCl}$ -,  $\text{NaNO}_3$ -,  $\text{KCl}$ -,  $\text{KNO}_3$ -Lösung und Aq. bidest., dagegen längere Plz und stärker konkave Plf. In den jungen wachsenden Blättern prägten sich durch die verschiedenen Vorbehandlungen hervorgerufene Veränderungen der Plasmaviskosität zuerst in der ausgewachsenen Blattspitze aus, erst später auch in der Streckungszone. In  $\text{NaCl}$ -,  $\text{NaNO}_3$ -,  $\text{KCl}$ -,  $\text{KNO}_3$ -Lösung und Aq. bidest. blieben (besonders in den Dunkelversuchen) verhältnismäßig lange (etwa 20 Tage) deutliche plasmatische Gradienten zwischen der Plz und Plf der Streckungszone und der ausgewachsenen Spitzenzone erhalten, in  $\text{CaCl}_2$ -,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung, Leitungs- und Standortwasser waren nach dieser Zeit nur noch geringe Unterschiede im plasmatischen Verhalten der Basal- und Spitzenzone zu verzeichnen.

Fischer (1948, 1949) konnte beim Altern eine Verschiebung des K/Ca-Verhältnisses zum Ca feststellen. Seine Plf-Untersuchungen an einer großen Zahl von Land- und Wasserpflanzen ergaben mit nur einer Ausnahme (*Ranunculus ficaria*) Viskositätsabnahme mit zunehmendem Alter. Es ist möglich, daß diese während des Alterungsprozesses auftretende Viskositätsabnahme mit dem zunehmenden Ca-Gehalt im Zusammenhang steht, vielleicht sogar durch die Verschiebung des K/Ca-Verhältnisses zum Ca bedingt wird. Die in unseren Versuchen mit Ca-Lösungen, Leitungswasser und Standortwasser beobachtete „Viskositätsverringering“ scheint eine verfrühte Alterserscheinung zu sein, die durch eine Störung des K/Ca-Gleichgewichtes hervorgerufen wird. Wahrscheinlich ist auch die nach längerer Isolation auftretende Abnahme der Cytoplasmaviskosität durch Alterungsprozesse bedingt. Die Verkürzung der Plz nach längerer Versuchsdauer wurde ebenfalls zuerst in den Ca enthaltenden Flüssigkeiten gemessen, was darauf schließen läßt, daß Ca-Ionen eine Rolle bei diesen Vorgängen spielen. Es kann sich dabei aber auch um zufällige Übereinstimmung handeln, da man das Vorhandensein von Ca-Ionen in der Außenlösung nicht direkt mit dem Ca-Gehalt der Pflanzen gleichsetzen kann.

Die mit der Plf- und Plz-Methode gewonnenen Ergebnisse über die Wirkung von Einsalzlösungen konnten keine Bestätigung durch die Zentrifugierungsmethode finden. Gerade Varianten, die sich nach den Plf- und Plz-Befunden stark unterschieden, stimmten nach den Zz-Messungen überein. Im Gegensatz zu den Plasmolysezeitbestimmungen, nach denen durch Ca-Lösungen die Viskosität herabgesetzt erschien, wirkt, nach der Zz-Methode zu urteilen, Ca den anderen Salzlösungen gegenüber etwas viskositätssteigernd. In jungen Blättern sind in der ersten Versuchswocde nach Behandlung mit verschiedenen Salzlösungen keine Unterschiede festzustellen. Erst nach 10 Tagen kann man nach den Zz-Ergebnissen Viskositätssteigerung in der Reihenfolge  $\text{Na} = \text{K} < \text{Ca}$  unterscheiden. Die mit den Plasmolysemethoden gemessene Verringerung der Viskosität durch Behandlung der isolierten Blätter mit Leitungswasser oder Standortwasser konnte ebenfalls mit der

Zentrifugierungsmethode nicht reproduziert werden. Im Gegenteil: In den so behandelten Blättern hatte sich die Viskosität am stärksten erhöht.

Während in den Plasmolyseversuchen Übereinstimmung in der Konsistenzänderung nach Vorbehandlung mit calciumhaltigen Lösungen zu verzeichnen war (Einsalzlösungen aus  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  wirkten ähnlich wie Leitungswasser und Standortwasser), konnte mit der Zentrifugierungsmethode keine gleichsinnige Wirkung festgestellt werden. Die Chloroplasten der in Einsalzlösungen kultivierten Blätter verlagerten sich bereits in kürzerer Zeit als die Plastiden der mit Aq. bidest. oder Leitungswasser und Standortwasser vorbehandelten Blätter. Es wurden also mit den verschiedenen Methoden ganz andere Viskositätsänderungen gemessen. Während nach der Plasmolysemethode auf eine einwandfreie Verminderung der Zähigkeit nach Ca-Einwirkung zu schließen wäre, ergaben die Zentrifugierungsversuche nur geringe Unterschiede nach Vorbehandlung mit den verschiedenen Kulturflüssigkeiten.

Die verkürzte Plz nach längerer Isolation wurde als Viskositätserniedrigung betrachtet, die der im normalen Alterungsprozeß auftretenden entspricht. Für diesen Vorgang wurden von Fischer (1948) mit beiden Methoden verschiedene Werte gewonnen. Er hält die Zentrifugierungsmethode für ungeeignet, weil sie die Plf-Befunde nicht zu bestätigen vermochte.

Mit zunehmender Versuchsdauer konnte in eigenen Versuchen abnehmende Verlagerungsfähigkeit der Chloroplasten beobachtet werden, was im Gegensatz zu den Plz- und Plf-Versuchen auf zunehmende Viskosität schließen ließe. Es konnte festgestellt werden, daß die Chloroplasten im Versuchsverlauf wesentlich kleiner werden. Ich möchte daher die bei allen Behandlungsweisen auftretende scheinbare Viskositätssteigerung größtenteils dem Kleinerwerden der Chloroplasten zuschreiben.

Wenn man der Berechnung der Viskosität die Stokessche Formel zugrunde legt

$$V = \frac{2 \cdot (D - d) \cdot K \cdot r^2}{9 \eta},$$

wobei  $V$  die Geschwindigkeit,  $D$  das spezifische Gewicht der Teilchen,  $d$  das spezifische Gewicht des Mediums,  $K$  die bewegende Kraft,  $r$  der Radius des Teilchens und  $\eta$  die Plasmaviskosität ist, geht der Radius der Teilchen zum Quadrat erhoben in die Formel ein. Es könnte also die Zz innerhalb von 3 Wochen auf das Vierfache ansteigen, wenn anfangs  $r^2 = 9 \mu$  und am Ende  $r^2 = 2,25 \mu$  ist.

Wenn schon am gleichen Objekt zwei Methoden der Viskositätsbestimmung zu verschiedenen Resultaten in bezug auf die K-Ca-Wirkung führen, so erscheint es durchaus wahrscheinlich, daß die Anwendung dieser Methoden auf verschiedene Versuchsobjekte nicht zu übereinstimmenden Werten führt. Heilbrunn (1928) schreibt: „It should be remembered that our statement regarding the effect of sodium, calcium, and other similar ions on the protoplasm is only true for the protoplasm of the interior of the cell.“ Er konnte im Zentrifugierungsversuch zeigen, daß die Viskosität des

Plasmas von Seeigelleiern und Stentor durch Ca-Ionen herabgesetzt wurde. Auch H. T. und R. T. Northen (1939), die sich allein der Zz-Methode bedienten, fanden bei 1—2 Std. lang mit verschiedenen Salzlösungen behandelten *Spirogyra*-Fäden in Ca eine Herabsetzung der Viskosität, in K- und Na-Lösungen entgegengesetzte Wirkung. Es handelt sich dabei aber um keinen allgemeingültigen Effekt ein- oder zweiwertiger Ionen, da sich andere Alkali- und Erdalkalitionen anders verhielten. Am gleichen Objekt konnte Weber (1924) in vergleichenden Plasmolyse- und Zz-Versuchen übereinstimmend feststellen, daß Ca-Lösungen die Viskosität erniedrigten, Na-Ionen sie erhöhten. Timmel (1927) dagegen maß an *Monarda* abnehmende Verlagerungsfähigkeit in der Reihenfolge K, Na, Li, Mg, Ba, Ca. Vergleichende Plasmolyse-Zentrifugierungsversuche von Weis (1926) an *Allium* ergaben übereinstimmend, daß  $\text{NH}_4$ , K, Na verflüssigend, Mg, Sr und Ca verfestigend auf das Plasma einwirken. Nach Untersuchungen von Genkel und Tsvetkova (1950) ist die Plz sukkulenter Pflanzen erhöht, wenn sie mit hypotonischen  $\text{CaCl}_2$ -Lösungen vorbehandelt wurden.

Einen nicht zu unterschätzenden Faktor bei der Ionenwirkung stellt die Konzentration der verwendeten Salzlösungen dar. Plasmolisierend wirkende Einsalzlösungen, in denen neben dem Salzeffekt der osmotische Wasserentzug auf die Plasmabeschaffenheit einwirkt, sind nicht mit hypotonischen Lösungen zu vergleichen. Bei Plasmolyse in hypertonen Calciumlösungen war die Plf meist stark konkav bis krampfartig und die Plz im Vergleich zu Kaliumlösungen stark verlängert. In welcher Weise sich die Konzentration und die Vorbehandlungsdauer auf die Viskositätsresultate auswirken, zeigte besonders deutlich die Arbeit von Cholodny und Sankewitsch (1933). Während m/20 bzw. m/30 Lösungen noch deutliche Unterschiede in der Plf von *Rhoeo*-Zellen bewirkten, waren nach Vorbehandlung mit m/40 bzw. m/60 Salzlösungen die Plasmolyseformen gleich. Für *Allium*-Zellen war die Dauer der Vorbehandlung entscheidend. Diese Daten weisen darauf hin, daß die Beziehungen des Kaliums und Calciums zur Viskosität komplizierter sind, als von vielen Autoren angenommen wurde.

Versuche mit Pflanzen, die unter K- oder Ca-Mangel angezogen wurden, ergaben ebenfalls Viskositätsunterschiede. Kalchhofer (1936) kam zu dem Schluß, daß Kaliummangel, also relativer Ca-Überschuß, die Viskosität gegenüber Ca-armen Pflanzen erhöht, Schmidt, Diwald und Stocker (1940) beschrieben entgegengesetzte Resultate. Pirson und Seidel (1950) fanden, daß K- und Ca-Mangel gleichsinnig auf die Viskosität einwirkten und daß man von keinem spezifischen Ioneneffekt sprechen kann. Sie betonten, daß „in keinem einzigen Fall eine Erhöhung der Plasmolysezeit, die man etwa bei dem durch Kaliummangel herbeigeführten relativen Calciumüberschuß nach Erfahrung anderer Autoren erwarten könnte, auch nur angedeutet ist“. Die Untersuchungen Fischers (1948) an alternierenden Pflanzen, deren relativer Ca-Gehalt erhöht ist, widersprechen ebenfalls der allgemeinen Meinung, daß Calcium die Viskosität erhöht. Die Befunde der vorliegenden Arbeit stehen also durchaus nicht vereinzelt da.

Die hier angeführten Tatsachen sprechen dafür, daß die heute bestehenden Vorstellungen von der Wirkung des Kaliums und Calciums auf das Protoplasma dringend einer Revision bedürfen. Selbst wenn man das Plasma einem einfachen Querkörper gleichsetzt, wird man nicht erwarten können, daß Kalium immer quellend, Calcium stets entquellend wirkt, da schon an Modellkolloiden je nach ihrer Ladung die Wirkung der Ionen eine andere ist. Es fehlt nicht an Stimmen, die auf diese Probleme hinweisen (Pirson und Seidel 1950, Fischer 1949, 1950). Eine endgültige Klärung dieses Fragenkomplexes wird erst möglich sein, wenn weitere Versuchsergebnisse vorliegen.

Übereinstimmende Resultate konnten mit beiden Methoden allein in bezug auf die Lichtwirkung erzielt werden: Dunkelheit wirkte stets viskositäts erhöhend. Daß die Teilchengröße (also die Chloroplastengröße) sehr dazu beitragen kann, die Zz-Werte zu verfälschen, wurde schon erwähnt. Vergleichen wir die Zz unter Berücksichtigung der Chloroplastengröße, so finden wir in der ersten Versuchswoche bei gleicher Chloroplastengröße im Licht eine Verlängerung der Zz um das Doppelte, im Dunkeln um das Dreifache. Der erste Anstieg kann auf das Leichterwerden der Chloroplasten durch den Stärkeabbau zurückgeführt werden, denn bei Versuchen mit entstärkten Blättern war schon am ersten Versuchstag die Zz verlängert. Als reell ist dagegen die erhöhte Plasmaviskosität der „Dunkelblätter“ gegenüber den „Hellblättern“ zu betrachten.

Nach den Ergebnissen der umfangreichen Arbeiten von Stålfelt (1946) und Virgin (1948, 1949 a, 1951, 1952, 1954) mit *Elodea* muß das Plasma dieser Pflanze gegen Lichteinwirkung sehr empfindlich sein und mit Viskositätsänderungen antworten (vgl. auch Weber 1929 b, Pekarek 1933, Fischer 1949), die mit der Zentrifugierungsmethode meßbar sind. In den Versuchen dieser Autoren wurden Pflanzen verwendet, deren täglicher lichtbedingter Viskositätsrhythmus (Stålfelt 1946, Virgin 1948, 1949 b) durch 72stündiges Verdunkeln ausgeglichen wurde. In so vorbehandelten Pflanzen konnte bei Anwendung hoher und niedriger Lichtintensitäten ein Anstieg der Viskosität, nach Einwirken mittlerer Lichtstärken eine Abnahme der Viskosität festgestellt werden. Für diese Plasmaveränderungen sind die Strahlen des blauen Spektralbereiches verantwortlich (Virgin 1952, 1954). Selbst innerhalb einer Zelle konnten durch Belichtung Unterschiede in der Viskosität verursacht werden. Im belichteten Zellteil erfolgte eine schnellere Verlagerung der Chloroplasten als im dunkel gehaltenen.

Bei den Untersuchungen Stålfelts und Virgins wurde nur die Zentrifugierungsmethode angewendet. Da Licht die Permeabilität verändert (Lepeschkin 1950, Meindl 1934), können bei Plasmolyseversuchen durch die permeabilitätserhöhende Wirkung des Lichtes Fehler verursacht werden. Die gute Übereinstimmung in bezug auf die Lichtwirkung zwischen Zz-Ergebnissen und Plf-Plz-Resultaten bei den vorliegenden Untersuchungen läßt darauf schließen, daß auch die Plasmolysewerte reale Viskositätsänderungen anzeigen.

Dem pH-Wert scheint innerhalb des verwendeten pH-Bereiches keine

wesentliche Bedeutung zuzukommen. In fast allen Lösungen änderte sich der pH-Wert während der Versuchsdauer nur wenig, während sich die nach der Zentrifugierungsmethode gefundenen Werte nach mehreren Tagen ganz wesentlich von ihren Ausgangsgrößen unterschieden. Für Leitungswasser und Standortwasser lag der pH-Wert bei Beginn des Versuchs bei 7,5, nach dem Einlegen der Blätter erfolgte schon am zweiten Versuchstag ein Anstieg auf pH 8. Der pH-Wert der Calciumlösungen beträgt etwa 6,0, für die anderen Lösungen konnte ein Wert von 6,5 gemessen werden. Da die mit der Plf- und Plz-Methode gemessene Wirkung des Calciums mehr den Leitungswasser- und Standortwasserwerten glich, der pH-Wert der Calciumlösungen aber mit den anderen Einsalzlösungen übereinstimmte, ist anzunehmen, daß dem pH-Wert der Lösungen kein merklicher Einfluß auf die Ergebnisse zukommt. Die nach der Zentrifugierungsmethode gewonnenen Resultate zeigten ebenfalls keinen Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration, da sich die Blätter in Standortwasser und Aq. bidest. fast gleich verhielten, obwohl die Medien einen anderen pH-Wert hatten. Zu ähnlichen Resultaten kam Virgin (1951), der ebenfalls keine Abhängigkeit der mit der Zentrifugierungsmethode gewonnenen Viskositätswerte von geringen pH-Differenzen messen konnte. Drawert (1952) wies für *Elodea* nach, daß zwischen pH 4,1–7,2 kein Einfluß der cH auf die Deplasmolysegeschwindigkeit besteht.

Am vorliegenden Objekt interessierte darüber hinaus der Zusammenhang zwischen Viskosität und Wachstumsphase. Strugger (1934) stellte an *Elodea densa* fest, daß sich die Zellen der Streckungszone von den Zellen ausgewachsener Blatteile und Blätter durch wesentlich verlängerte Plz und konkavere Plf unterscheiden. Es sind „protoplasmatische Gradienten“ im Blatt vorhanden, die mit den Wachstumszonen zusammenfallen. Diese Beobachtung veranlaßte ihn, kausale Zusammenhänge zwischen Streckungswachstum und Plasmaviskosität anzunehmen. Ähnliche mit dem Wachstum verknüpfte Gradienten konnten Borriß (1934), Kressin (1935), Ruge (1937, 1940) und Fischer (1948) nachweisen. 1938 wurden von Borriß auf Grund seiner vergleichenden Untersuchungen an *Elodea densa* und *Elodea crispa* Bedenken gegen die Struggerschen Vorstellungen geäußert. Ruge (1937, 1940) fand zwar Longitudinalgradienten der Viskosität und bestätigte die Ansicht Struggers, daß junge wachsende Zellen im allgemeinen visköser sind als ausgewachsene, lehnte aber ebenfalls eine kausale Verknüpfung des Viskositätsgrades mit dem Streckungswachstum ab, da die Erhöhung der Plasmakonsistenz nicht vor der Streckung erfolgte. Zu ähnlichen Resultaten kamen Pirson und Seidel (1950) an Lemnawurzeln. Sie konnten die längsten Plasmolysezeiten bei den Zellen messen, die bereits als ausgewachsen zu betrachten sind. In den Blättchen von *Fontinalis antipyretica* sind gerade die Zellen der Streckungszone früher konvex plasmolysiert als die ausgewachsenen Zellen (Borriß und Günther 1952). Die bisher gegen die besagte Hypothese vorgebrachten Argumente wurden zum Teil durch Heranziehung neuer Objekte erbracht. Es erschien daher wesentlich, an dem von Strugger gewählten Objekt die Zusam-

menhänge zwischen Streckungswachstum und Plasmazustand erneut zu analysieren.

Um zur Lösung dieser Frage beizutragen, wurde

1. die Plz und Plf wachsender und ausgewachsener Zellen unter Berücksichtigung des Hypertoniegrades bestimmt,
2. eine weitere Methode der Viskositätsbestimmung (Zz-Messungen) zu den vergleichenden Untersuchungen herangezogen und
3. durch physikalische und chemische Faktoren die Plasmaviskosität beeinflusst, um experimentell protoplasmatische Veränderungen zu erzeugen.

Zunächst konnten die Angaben Struggers über konkave Plf der wachsenden Zellen und Konvexplasmolyse bei Zellen der ausgewachsenen Zone bestätigt werden. Auch bei Verwendung von Plasmolytika, die den verschiedenen Konzentrationen des Zellsaftes angepaßt waren, konnten große Unterschiede in der Plf und Plz zwischen Streckungszone und ausgewachsener Spitze nachgewiesen werden. Beim Vergleich zwischen Plz und Zelllänge (Abb. 8) war ein klarer Zusammenhang zwischen beiden Größen im Sinne Struggers festzustellen. Wenn diese protoplasmatischen Verhältnisse wirklich kausal mit dem Streckungswachstum verknüpft wären, sollte man erwarten, daß in dem Augenblick, in dem das Wachstum eingestellt wird, auch die protoplasmatischen Gradienten verschwinden. Wie Blattlängenmessungen ergeben haben, wuchsen die abgetrennten jungen Blätter nach der Isolation nicht mehr, es dürften also nach der Isolation auch keine Viskositätsunterschiede vorhanden sein.

Die Blätter wurden in Petrischalen mit den verschiedenen Lösungen über Millimeterpapier gemessen. Bei mikroskopischen Längenmessungen konnte ebenfalls kein Zuwachs festgestellt werden. Da die Blätter beim wiederholten Auflegen auf den Objektträger stark litten, wurde diese Methode aufgegeben. Die in der Tab. 6 angeführten Werte stellen das Mittel aus je 20 Messungen dar,  $s_x$  gibt den mittleren Fehler an.

Obwohl das Wachstum nach der Isolation eingestellt wurde, unterschieden sich auch nach fünftägiger Isolation die Zellen der Streckungszone von denen der ausgewachsenen Zone durch wesentlich längere Plz und krampfartige und konkave Plf. Selbst nach 10 Tagen waren noch deutliche Viskositätsgradienten vorhanden. Diese Befunde sprechen keineswegs für Kausalzusammenhänge. Es ist anzunehmen, daß im Zusammenhang mit dem Wachstum Konsistenzänderungen des Plasmas vor sich gehen, die mit der Plf- und Plz-Methode meßbar sind, doch ist es wenig wahrscheinlich, daß diese die primäre Wachstumsursache darstellen.

Aus den Plasmolyseuntersuchungen war zu schließen, daß das Plasma wachsender *Elodea*-Blätter in der Streckungszone wesentlich zähflüssiger ist als im ausgewachsenen Blatteil. Ein völlig anderes Bild vermitteln dagegen die Zentrifugenversuche, nach denen man das Gegenteil annehmen müßte. Neben der Viskosität haben Chloroplastengröße und Stärkegehalt einen entscheidenden Einfluß auf die Zentrifugenwerte. Da die Chloroplasten der Streckungszone nur halb so groß sind wie die der ausgewachsenen Zone, müßte man hier selbst bei gleicher Viskosität eher längere Zzen erwarten.

Wie die Abb. 12 zeigt, waren aber gerade für die Streckungszone nur kurze Zeiten zur Verlagerung der Chloroplasten nötig. Durch die Chloroplastengröße kann also die kurze Verlagerungszeit der Chloroplasten in der Streckungszone nicht bedingt sein. Eine weitere Fehlermöglichkeit ist durch den verschiedenen Stärkegehalt gegeben. Da aber nur im basalen Blatteil viel Stärke vorhanden war, können die Resultate nicht durch den Stärkegehalt verfälscht sein, so daß wirklich mit geringerer Plasmaviskosität in den wachsenden Zellen zu rechnen ist. Die sehr schnell erfolgende Rückverlagerung der Chloroplasten wirkte bei der Auswertung sehr störend. Durch sofortige Beobachtung und durch Abtöten der Blätter in Carnoyschem Gemisch wurden mögliche Fehler ausgeschaltet. Die mit der Zentrifugemethode ermittelten Ergebnisse widersprechen also ebenfalls den Struggerschen Vorstellungen. Virgin (1951) konnte mit der Zz-Methode an *Elodea*-Blättern ebenfalls die geringste Viskosität bei jungen Blättern feststellen. Zunahme der Viskosität beim Altern wurde mit der gleichen Methode von Maximow und Moshaeva (1944) an *Vicia Faba* gemessen.

Nach der Isolation blieben die in jungen wachsenden Blättern bei Versuchsbeginn gemessenen Gradienten in den ersten fünf Versuchstagen bestehen. Dann glichen sich die Werte der ehemaligen Wachstumszonen den Werten der ausgewachsenen Spitzenzone an. Es ließen sich also auch mit der Zz-Methode plasmatische Unterschiede zwischen Wachstumszone und ausgewachsenem Blatteil ermitteln. Obwohl das Wachstum eingestellt wurde, blieben diese Gradienten etwa 5 Tage bestehen. Wenn die nach der Zz-Methode gemessenen Werte auch im Gegensatz zu den nach der Plf-Plz-Methode ermittelten stehen, indem nach der ersten Methode wachsende Zellen geringere Viskosität als ausgewachsene, nach der Zz-Methode wachsende Zellen aber höhere Viskosität haben sollten, stimmen die nach den verschiedenen Methoden gewonnenen Resultate doch in folgenden drei Punkten überein:

1. Während des Wachstums bestehen plasmatische Unterschiede zwischen Wachstumszone und ausgewachsener Zone.
2. In den ersten Tagen nach dem Wachstumsstillstand bleiben diese Gradienten bestehen.
3. Etwa 5 Tage nach der Isolation beginnt ein Ausgleich der plasmatischen Gradienten.

Eine Beeinflussung des Streckungswachstums durch verschiedene Ionen, wie es von Borowikow (1916), Borriß (1937, 1939), Wuhrmann (1938) und Libbert (1953) nachgewiesen wurde, konnte an noch wachstumsfähigen, isolierten *Elodea*-Blättern nach dem Einlegen in verschiedene Neutralsalzlösungen nicht gemessen werden. Obwohl in den Blättern Viskositätsänderungen zu beobachten waren, blieb eine ionale Wachstumsbeeinflussung aus.

Es verhielt sich also selbst in unbehandelten Blättern nur das Ektoplasma in der von Strugger angegebenen Weise, das Endoplasma reagierte grundlegend anders. Auf Grund der Versuchsergebnisse ist es nicht möglich, die Plasmaviskosität als ursächlich mit dem Streckungswachstum verknüpft

Tab. 6. *Blattlängenmessungen*

Behandlung	Datum	Blattlänge		Blattlänge		Blattlänge	
		in mm	$s_{\bar{x}}$	in mm	$s_{\bar{x}}$	in mm	$s_{\bar{x}}$
NaCl D	1. 3.	7,6	0,235	12,3	0,194	15,7	0,221
	2. 3.	7,7	0,241	12,2	0,190	15,5	0,264
	3. 3.	7,6	0,263	11,6	0,254	15,8	0,272
	4. 3.	7,5	0,254	12,1	0,190	15,6	0,264
	5. 3.	7,7	0,262	11,8	0,178	15,3	0,289
NaNO <sub>3</sub> D	1. 3.	7,7	0,181	11,7	0,178	15,6	0,310
	2. 3.	7,4	0,158	11,6	0,170	15,4	0,346
	3. 3.	7,3	0,164	11,6	0,168	15,4	0,320
	4. 3.	7,3	0,166	11,7	0,183	15,4	0,352
	5. 3.	7,3	0,197	11,7	0,168	15,5	0,320
KCl D	1. 3.	7,0	0,290	11,7	0,185	15,5	0,240
	2. 3.	7,5	0,229	11,7	0,251	15,3	0,252
	3. 3.	7,4	0,232	11,6	0,228	15,3	0,266
	4. 3.	7,4	0,239	11,7	0,207	15,3	0,250
	5. 3.	7,3	0,260	11,5	0,160	15,1	0,281
KNO <sub>3</sub> D	1. 3.	7,8	0,180	12,0	0,216	15,8	0,311
	2. 3.	7,6	0,189	11,7	0,249	15,5	0,369
	3. 3.	7,4	0,178	11,8	0,215	15,5	0,301
	4. 3.	7,4	0,185	11,5	0,243	15,3	0,349
	5. 3.	7,1	0,197	11,5	0,253	15,3	0,349
CaCl <sub>2</sub> D	1. 3.	7,6	0,238	11,7	0,180	15,8	0,289
	2. 3.	7,6	0,262	11,7	0,189	15,6	0,303
	3. 3.	7,4	0,241	11,6	0,180	15,7	0,398
	4. 3.	7,4	0,254	11,6	0,180	15,7	0,420
	5. 3.	7,3	0,247	11,5	0,147	15,4	0,403
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> D	1. 3.	8,2	0,174	12,0	0,197	15,6	0,339
	2. 3.	7,8	0,194	11,9	0,204	15,5	0,323
	3. 3.	7,8	0,180	11,7	0,205	15,3	0,359
	4. 3.	7,7	0,185	11,7	0,227	15,5	0,321
	5. 3.	7,8	0,162	11,6	0,185	15,2	0,308
Aq. bidest. D	1. 3.	7,8	0,219	12,0	0,229	16,0	0,210
	2. 3.	7,3	0,189	11,8	0,235	15,7	0,235
	3. 3.	7,5	0,185	11,9	0,229	15,8	0,202
	4. 3.	7,3	0,211	11,8	0,228	15,8	0,229
	5. 3.	7,6	0,245	11,3	0,231	15,9	0,207
Leitungs- wasser D	1. 3.	7,6	0,213	12,2	0,221	16,5	0,264
	2. 3.	7,5	0,197	12,0	0,275	16,5	0,287
	3. 3.	7,8	0,202	12,1	0,254	16,5	0,313
	4. 3.	7,4	0,207	12,0	0,271	16,4	0,306
	5. 3.	7,4	0,222	11,6	0,308	16,3	0,316
Standort- wasser D	1. 3.	8,0	0,218	11,8	0,212	16,6	0,279
	2. 3.	7,7	0,239	11,6	0,204	16,5	0,271
	3. 3.	7,8	0,235	11,6	0,200	16,5	0,249
	4. 3.	7,3	0,250	11,4	0,243	16,3	0,245
	5. 3.	7,0	0,200	11,1	0,287	15,6	0,345

Behandlung	Datum	Blattlänge		Blattlänge		Blattlänge	
		in mm	$s_{\bar{x}}$	in mm	$s_{\bar{x}}$	in mm	$s_{\bar{x}}$
NaCl H	1. 3.	7,8	0,259	11,5	0,231	16,5	0,247
	2. 3.	7,7	0,270	11,6	0,253	16,4	0,287
	3. 3.	7,7	0,264	11,5	0,269	16,5	0,273
	4. 3.	7,6	0,246	11,5	0,275	16,3	0,287
	5. 3.	7,5	0,218	11,3	0,265	16,4	0,281
NaNO <sub>3</sub> H	1. 3.	7,6	0,222	11,8	0,208	16,2	0,294
	2. 3.	7,6	0,236	11,7	0,225	15,9	0,295
	3. 3.	7,3	0,212	11,7	0,242	15,9	0,318
	4. 3.	7,4	0,208	11,6	0,199	15,8	0,302
	5. 3.	7,3	0,225	11,7	0,221	16,1	0,342
KCl H	1. 3.	7,6	0,185	12,0	0,200	16,9	0,370
	2. 3.	7,4	0,170	11,7	0,192	15,7	0,311
	3. 3.	7,2	0,200	11,8	0,199	15,9	0,300
	4. 3.	7,4	0,178	12,0	0,156	16,1	0,275
	5. 3.	7,5	0,173	11,9	0,185	15,7	0,345
KNO <sub>3</sub> H	1. 3.	7,6	0,197	11,5	0,158	16,4	0,291
	2. 3.	7,5	0,215	11,4	0,162	15,7	0,328
	3. 3.	7,5	0,290	11,5	0,176	15,5	0,331
	4. 3.	7,5	0,225	11,3	0,180	16,3	0,301
	5. 3.	7,5	0,232	11,5	0,152	16,3	0,318
CaCl <sub>2</sub> H	1. 3.	7,9	0,215	12,0	0,172	16,0	0,259
	2. 3.	7,5	0,250	11,3	0,226	15,9	0,260
	3. 3.	7,3	0,231	11,9	0,189	15,8	0,305
	4. 3.	7,5	0,249	11,9	0,215	15,9	0,262
	5. 3.	7,6	0,247	11,9	0,185	15,8	0,270
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> H	1. 3.	8,0	0,231	11,9	0,210	16,5	0,275
	2. 3.	7,8	0,377	11,8	0,239	15,5	0,352
	3. 3.	7,6	0,255	11,8	0,239	16,2	0,301
	4. 3.	7,5	0,239	11,8	0,270	16,2	0,305
	5. 3.	7,8	0,259	11,7	0,213	16,1	0,302
Aq. bidest. H	1. 3.	7,8	0,178	12,0	0,224	16,4	0,254
	2. 3.	7,6	0,160	11,8	0,228	16,2	0,210
	3. 3.	7,6	0,160	11,7	0,238	16,2	0,264
	4. 3.	7,6	0,210	11,5	0,267	16,3	0,259
	5. 3.	7,6	0,224	11,7	0,269	16,3	0,302
Leitungs- wasser H	1. 3.	7,5	0,215	12,1	0,243	16,3	0,242
	2. 3.	7,2	0,219	12,0	0,229	16,0	0,241
	3. 3.	7,2	0,207	11,9	0,227	16,0	0,258
	4. 3.	7,1	0,221	11,8	0,219	15,2	0,390
	5. 3.	7,3	0,229	11,9	0,251	16,2	0,301
Standort- wasser H	1. 3.	7,5	0,239	11,7	0,221	15,9	0,254
	2. 3.	7,3	0,236	11,6	0,213	15,6	0,265
	3. 3.	7,3	0,254	11,6	0,207	15,6	0,253
	4. 3.	7,0	0,227	11,0	0,251	15,6	0,279
	5. 3.	6,2	0,154	10,9	0,265	15,4	0,318

anzusehen. Es ist vielmehr wahrscheinlich, daß als Folge zahlreicher physiologischer Prozesse, die in der Zelle beim Streckungswachstum ablaufen, auch Veränderungen in der Hydratation der Plasmakolloide auftreten. Für die Richtung der Viskositätsverschiebungen (Erhöhung oder Erniedrigung) scheinen keine allgemeingültigen Gesetzmäßigkeiten zu bestehen.

## VI. Zusammenfassung

### 1. Veränderungen des osmotischen Wertes:

Nach dem Abtrennen der Blätter vom Sproß (Isolation und Einlegen in verschiedene Lösungen) steigt der OG (osmotische Wert) im allgemeinen (Ausnahme Ba<sup>++</sup>) in folgender Reihenfolge an: Ba < Kontrolle < Aq. bidest. < Mg = Ca < Na < Standortwasser = Leitungswasser < K. Chloride und Nitrate unterscheiden sich in ihrer Wirkung auf den OG nicht wesentlich. Belichtete Blätter haben höhere osmotische Werte als dunkel gehaltene.

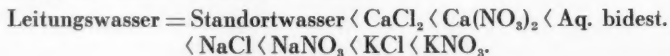
In wachsenden Blättern nimmt die Zellsaftkonzentration innerhalb der Streckungszone ab und steigt zur Blattspitze an. Dieser Gradient ist nach Einstellung des Wachstums nicht mehr festzustellen.

### 2. Veränderungen der Protoplasmaviskosität.

Es werden die Fehlermöglichkeiten der Methoden zur Viskositätsbestimmung diskutiert. Um durch Veränderungen des OG bewirkte Fehler der Plf- und Plz- (Plasmolyseform und -zeit-) Methode auszuschalten, wird neben einem Plasmolytikum konstanter Konzentration ein dem OG angepaßtes Plasmolytikum verwendet.

Durch Belichtung und Einlegen isolierter Blätter in Einsalzlösungen, Leitungswasser, Standortwasser oder Aq. bidest. kann die Viskosität des Plasmas verändert werden. Dabei ergeben sich je nach der zur Viskositätsbestimmung verwendeten Methode unterschiedliche Resultate. Zur Erklärung dieser Diskrepanz wird angenommen, daß die Zz- (Zentrifugierungs-) Methode Einblick in den Zustand des Binnenplasmas ermöglicht, die Plz- und Plf-Methode dagegen ein Bild von der Konsistenz des Ektoplasmas gibt.

Der Einfluß der verschiedenen Salzlösungen prägt sich vor allem im Verhalten des Außenplasmas aus. Im Gegensatz zu den Befunden anderer Autoren konnte keine verfestigende Wirkung hypotonischer Calciumsalzlösungen festgestellt werden. Für den Anstieg der Viskosität im Ektoplasma kann folgende Reihe aufgestellt werden:



Auf das Binnenplasma hat die Art der verwendeten Kulturflüssigkeit wenig Einfluß. Durch Einsalzlösungen wurde die Viskosität gegenüber dem Plasma von „Leitungswasser-, Standortwasser- und Aq. bidest.-Blättern“ etwas herabgesetzt.

Dem Licht kommt in bezug auf das Gesamtplasma viskositätsmindernde Wirkung zu.

In jungen wachsenden *Elodea*-Blättern unterscheidet sich die Streckungszone von der ausgewachsenen Spitzenzone durch konkavere Plf und längere

Plz, so daß auf höhere Viskosität des Ektoplasmas der Streckungszone zu schließen ist. Das Binnenplasma wachsender Blätter zeigt entgegengesetzt gerichtete Gradienten: Die Viskosität in der Streckungszone ist geringer als in der ausgewachsenen Zone. Nach der Isolation der Blätter wird das Wachstum eingestellt, die Viskositätsunterschiede zwischen ausgewachsenen und noch wachstumsfähigen Zellen bleiben aber noch mehrere Tage bestehen.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Borriss, möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, für Ratschläge und ständiges Interesse meinen Dank aussprechen.

#### Literatur

- Bächer, J., 1920: Über die Abhängigkeit des osmotischen Wertes von einigen Außenfaktoren. Bot. Zbl., Beih. 37, 63—113.
- Bělehrádek, J., et J. Melichar, 1930: L'action différente des températures élevées et des températures normales sur la survie de la cellule végétale (*Helodea canadensis* Rich.). Biol. gen. 6, 109—124.
- Benecke, W., 1907: Über die Giftwirkung verschiedener Salze auf *Spirogyra* und ihre Entgiftung durch Calciumsalze. Ber. deutsch. bot. Ges. 25, 322—337.
- Blagowestschenski, A. W., 1928: Untersuchungen über die osmotischen Werte bei Pflanzen Mittelasiens. Jb. wiss. Bot. 69, 191—236.
- Borowikow, G., 1916: Über die Einwirkung von salzartigen Stoffen auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Pflanzen (russisch). Mém. de la Soc. d. naturalistes de la Nouvelle Russie, Odessa 41, 15—194.
- Borriss, H., 1934: Beiträge zur Wachstums- und Entwicklungsphysiologie der Fruchtkörper von *Coprinus lagopus*. Planta 22, 28—69.
- 1937: Die Beeinflussung des Streckungswachstums durch Salze. I. Mitt.: Die Wirkung von reinen Salzlösungen auf das Wachstum etiolierter Keimlinge. Jb. wiss. Bot. 85, 732—769.
- 1938: Plasmolyseform und Streckungswachstum. Jb. wiss. Bot. 86, 784—831.
- 1939: Die Beeinflussung des pflanzlichen Wachstums durch die Neutralsalze der Alkali- und Erdalkalimetalle. Ernährung d. Pflanze 35, 289—297.
- und E. Günther, 1952: Zellphysiologische Studien an *Fontinalis antipyretica* (unveröffentl. Manuskript).
- Brauner, L., 1932: Das kleine pflanzenphysiologische Praktikum, II. Bd. Jena.
- Brenner, W., 1920: Über die Wirkung von Neutralsalzen auf die Säureresistenz, Permeabilität und Lebensdauer der Protoplasten. Ber. deutsch. bot. Ges. 38, 277—285.
- Buhmann, A., 1935: Kritische Untersuchungen über vergleichende plasmolytische und kryoskopische Bestimmungen des osmotischen Wertes bei Pflanzen. Protoplasma 23, 579—612.
- Cholodny, N., und E. Sankewitsch, 1933: Plasmolyseform und Ionenwirkung. Protoplasma 20, 57—72.
- Collins, A., 1931: Giftresistenz verschieden alter *Elodea*-Blätter. Protoplasma 12, 549—553.
- Dellinghausen, M. v., 1936: Entwicklungsgeschichtlich-genetische Untersuchungen an *Epilobium*. VIII. Über vergleichende Viskositätsmessungen an zwei genetisch verschiedenen Plasmen. Planta 25, 282—301.

- Diehl, J. M., 1936: Einige Beobachtungen über die Aufnahme von Farbstoffen durch die Blätter von *Helodea densa* und *Helodea canadensis*. Rec. trav. bot. néerl. 33, 502—508.
- Drawert, H., 1937: Protoplasmatische Anatomie des fixierten *Helodea*-Blattes. Protoplasma 29, 206—227.
- 1952: Kritische Untersuchungen zur gravimetrischen Bestimmung der Wasserpermeabilität. Ein Beitrag zum Einfluß der cH auf die Wasseraufnahme und -abgabe. Planta 41, 65—82.
- Erbring, H., 1936: Untersuchungen über die Spinnbarkeit flüssiger Systeme. Kolloid-Beih. 44, 171—237.
- Esterak, K. B., 1935: Resistenz-Gradienten in *Helodea*-Blättern. Protoplasma 23, 367—383.
- Fischer, H., 1948: Plasmolyseform und Mineralsalzgehalt in alternden Blättern. I. Mitt. *Helodea* und *Fontinalis*. Planta 35, 513—527.
- 1949: Plasmolyseform und Mineralsalzgehalt in alternden Blättern. II. Mitt. Planta 37, 244—292.
- 1950: Über protoplasmatische Veränderungen beim Altern von Pflanzenzellen. Sammelref. Protoplasma 39, 661—676.
- Fitting, H., 1928: Untersuchungen über Chemodinese bei *Vallisneria*. Jb. wiss. Bot. 67, 427—596.
- Frederikse, A. M., 1934: Eine Interferenzmethode zur mikroskopischen Beobachtung lebender Zellen. Z. mikrosk.-anat. Forsch. 36, 545—553.
- Frey-Wyssling, A., 1948: Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives. New York.
- Gahlen, K., 1935: Beiträge zur Physiologie der Blattzellen von *Helodea canadensis*. Protoplasma 22, 337—361.
- Gamma, H., 1932: Zur Kenntnis der Saugkraft und des Grenzplasmolysewertes der Submersen. Protoplasma 16, 489—575.
- Genkel, P. A., und J. V. Tsvetkova, 1950: Der Einfluß von Salzen auf die Viskosität des Protoplasmas und die Hitzewiderstandsfähigkeit von Pflanzenzellen (russisch). Dokl. Akad. Nauk SSSR 74, 1025—1028.
- Heilbrunn, L. V., 1925: The centrifuge method of determining protoplasmic viscosity. J. Exper. Zool. 43, 313—320.
- 1928: The colloid chemistry of protoplasm. Protoplasma-Monographien. Bd. I. Berlin.
- Kalchhofer, Z., 1936: Protoplasmazustand nährsalzmangelkranker Pflanzen. Protoplasma 26, 249—281.
- Kessler, W., 1935: Über die inneren Ursachen der Kälteresistenz der Pflanzen. Planta 24, 312—352.
- und W. Ruhland, 1938: Weitere Untersuchungen über die inneren Ursachen der Kälteresistenz. Planta 28, 159—204.
- Kressin, G., 1935: Beiträge zur vergleichenden Protoplasmatik der Mooszelle. Diss. Greifswald.
- Küster, H., 1910: Über Inhaltsverlagerungen in plasmolysierten Zellen. Flora 100, 267—287.
- 1929: Pathologie der Pflanzenzelle. I. Teil. Pathologie des Protoplasmas. Protoplasma-Monographien. III. Berlin.
- Lepeschkin, W., 1930: Light and the permeability of protoplasm. Amer. J. Bot. 17, 953—970.

- Libbert, E., 1955: Die Wirkung der Alkali- und Erdalkalitionen auf das Wurzelwachstum unter besonderer Berücksichtigung des Ionenantagonismus und seiner Abhängigkeit von Milieufaktoren. *Planta* 41, 396—435.
- Macke, W., 1959: Untersuchungen über die Wirkung des Bors auf *Helodea canadensis*. *Z. Bot.* 54, 241—267.
- Marklund, G., 1956: Vergleichende Permeabilitätsstudien an pflanzlichen Protoplasten. *Acta Bot. Fenn.* 18, 1—107.
- Maximov, N. A., and L. V. Moshaeva, 1944: Age variations in the colloidal-chemical properties of protoplasm of vegetable cells. II. Variations in permeability and viscosity in the leaf cells of broadbeans and oats. *C. r. Acad. Sci. l'URSS* 42, 277—280.
- Meindl, T., 1954: Weitere Beiträge zur protoplasmatischen Anatomie des *Helodea*-Blattes. *Protoplasma* 21, 362—393.
- Missbach, G., 1928: Versuche zur Prüfung der Plasmaviskosität. *Protoplasma* 3, 327—344.
- Moder, A., 1952: Beiträge zur protoplasmatischen Anatomie des *Helodea*-Blattes. *Protoplasma* 16, 1—55.
- Northern, H. T., and R. T., 1939: Effects of cations and anions on protoplasmic elasticity. *Plant Physiol.* 14, 539—546.
- H. T., 1946: Effects of various agents on the structural viscosity of *Elodea* protoplasm. *Plant Physiol.* 21, 148—154.
- Oppenheimer, H. R., 1952: Über Zuverlässigkeit und Anwendungsgrenzen der üblichsten Methoden zur Bestimmung der osmotischen Konzentration pflanzlicher Zellsäfte. *Planta* 16, 467—517.
- Pekarek, J., 1950: Absolute Viskositätsmessungen mit Hilfe der Brownschen Molekularbewegung. I. Prinzip der Methode. *Protoplasma* 10, 510—532.
- 1953: Absolute Viskositätsmessungen mit Hilfe der Brownschen Molekularbewegung. VII. Der Einfluß des Lichts auf die Zellsaftviskosität. *Protoplasma* 20, 359—375.
- und R. Fürth, 1951: Über die Richtung der Protoplasmaströmung in benachbarten *Helodea*-Blattzellen. *Protoplasma* 15, 666—700.
- Pirson, A., und F. Seidel, 1950: Zell- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* L. unter besonderer Berücksichtigung von Kalium- und Kalziummangel. *Planta* 38, 431—473.
- Prud'homme van Reine, W. R., 1935: Versuche über die Konsistenz des Protoplasmas. *Rec. trav. bot. néerl.* 32, 467—515.
- Ruge, U., 1937: Untersuchungen über den Einfluß des Heteroauxins auf das Streckungswachstum des Hypokotyls von *Helianthus annuus*. *Z. Bot.* 31, 1—56.
- 1940: Kritische zell- und entwicklungsphysiologische Untersuchungen an den Blattzähnen von *Helodea densa*. *Flora* 134, 311—376.
- Searth, G. W., 1927: The structural organisation of plant protoplasm in the light of micrurgy. *Protoplasma* 2, 189—205.
- Schmidt, H., G. Diwald und O. Stocker, 1940: Plasmatische Untersuchungen an dürrerepfindlichen und dürreresistenten Sorten landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. *Planta* 31, 559—596.
- Seifriz, W., 1923: Observations on the reaction of protoplasm to some reagents. *Annals Bot.* 37, 489—507.
- Stälfelt, M. G., 1946: The influence of light upon the viscosity of protoplasm. *Arkiv för Botanik* 33 A, No. 4, 1—17.
- 1948: Soil substances affecting the viscosity of the protoplasm. *Sv. Bot. Tidskr.* 42, 17—33.

- Stålfelt, M. G., 1949 a: The lability of the protoplasmic viscosity. *Physiol. Plant.* 2, 340—349.
- 1949 b: Effect of heteroauxin and colchicin on protoplasmic viscosity. *Exper. Cell Res. Suppl.* 1, 63.
- Strügger, S., 1934: Beiträge zur Physiologie des Wachstums. I. Zur protoplasmaphysiologischen Kausalanalyse des Streckungswachstums. *Jb. wiss. Bot.* 79, 406—471.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Takamine, N., 1939: On the plasmolysisform in *Allium cepa* with special reference to the influence of potassium ion upon it. *Cytologia* 10, 302—323.
- Timmel, H., 1927: Zentrifugierungsversuche über die Wirkung chemischer Agenzien, insbesondere des Kaliums auf die Viskosität des Protoplasmas. *Protoplasma* 3, 197—212.
- Ursprung, A., 1939: Die Messung der osmotischen Zustandsgrößen pflanzlicher Zellen und Gewebe. *Hdb. d. Biol. Arbeitsmethoden*, Abt. XI, Teil 4, II, 1109—1572.
- Virgin, H. L., 1948: Changes in the viscosity of the cytoplasm of *Helodea densa* Casp. during continuous illumination. *Physiol. Plant.* 1, 147—155.
- 1949 a: The relation between the viscosity of the cytoplasm, the plasma flow, and the motive force. An experimental study. *Physiol. Plant.* 2, 157—163.
- 1949 b: Changes in the viscosity of *Spirogyra cytoplasm* under the influence of light. *Exper. Cell Res. Suppl.* 1, 79.
- 1951: The effect of light on the protoplasmic viscosity. *Physiol. Plant.* 4, 255—357.
- 1952: An action spectrum for the light induced changes in the viscosity of plant protoplasm. *Physiol. Plant.* 5, 575—582.
- 1954: Further studies of the action spectrum for light-induced changes in the protoplasmic viscosity of *Helodea densa*. *Physiol. Plant.* 7, 343—353.
- Walter, H., 1931: Die Hydratur der Pflanze. Jena.
- Weber, F., 1921: Das Fadenziehen und die Viskosität des Protoplasmas. *Öst. bot. Z.* 70, 172—180.
- 1924 a: Methoden der Viskositätsbestimmung des lebenden Protoplasmas. *Hdb. d. Biol. Arbeitsmethoden*, Abtl. XI, Teil 2, 655—718.
- 1924 b: Plasmolyseform und Protoplasmaviskosität. *Öst. bot. Z.* 73, 261—266.
- 1925: Über die Beurteilung der Plasmaviskosität nach der Plasmolyseform. *Z. Mikrosk.* 42, 146—156.
- 1929 a: Plasmolysezeitmethode. *Protoplasma* 5, 622—624.
- 1929 b: Plasmolysezeit und Lichtwirkung. *Protoplasma* 7, 256—258.
- 1929 c: Plasmolyseort (Sammelreferat). *Protoplasma* 7, 583—601.
- 1929 d: Zentrifugierung und Protoplasmaviskosität. *Protoplasma* 7, 444—445.
- Weis, A., 1926: Beiträge zur Kenntnis der Plasmahaut. *Planta* 1, 145—186.
- Wischmann, J., 1910: Über die Giftwirkung verschiedener Elektrolyte und Elektrolytgemische auf *Spirogyra*. Diss. Kiel.
- Wuhrmann, K., 1938: Der Einfluß von Neutralsalzen auf das Streckungswachstum der *Avena*-Koleoptile. *Protoplasma* 29, 361—393.

# A Unified Theory of Cellular Rate Processes Based upon an Analysis of Temperature Action

By

Jan Bělehrádek, London

With 4 Figures

(Received May 3, 1956)

## a) Introduction

Extensive comparative study pursued for a number of years on the temperature-velocity relation of various biological processes (Bělehrádek 1926—1935), recently completed by a study of certain enzyme reactions (1954), makes it possible to formulate a theory which brings under one heading certain kinetic aspects of the following processes:

- (i) simple cellular physiological manifestations;
- (ii) protoplasmic viscosity;
- (iii) cellular permeability and electric conductance;
- (iv) certain enzyme reactions.

An attempt to group such apparently different phenomena under one theory may *a priori* appear doubtful; but on closer investigation it will be realised that they differ from each other in the experimental methods by which they are studied and in the particular types of biological thinking currently attached to them, rather than in their nature. In fact, they all have the following features in common:

- (1) They all involve some kind of molecular or ionic movement taking place in the presence of, or with the participation of, hydrated protein molecules, and consequently in the presence of fields of associative forces centred in the protein molecules and their particular atomic groups, and in the attached molecules of water.
- (2) Their kinetics are connected with a certain resistance which opposes free movements of molecules and ions travelling across the fields of these forces.
- (3) The relation between their rate and temperature can be expressed by one common type of equation (see below) that can also be applied to the rate-temperature relations in the cognate inorganic processes.

### b) Molecular resistance in living systems

The theory presented here proposes to envisage the kinetics of cellular rate processes in terms of molecular resistance rather than in terms of molecular energy, without however denying the basic importance of the latter and the close interdependence of them both. The "energetic" view, vigorously defended on a broad basis during the last three decades, did not provide any final solution to the problem of cytochemical kinetics; and the resistance factor, although thought to be of importance by many earlier investigators, has not received full and systematic attention until now (cf. Bělehrádek 1930, 1932, 1935).

The theory put forward here is a completed and rectified version of a hypothesis first suggested by the author in 1926-27, presented in a more detailed form nine years later, and now expanded with regard to the recent concepts of protein molecular structure and of the part played by the hydrogen bridges and other weak bonds in the structure of living matter (Seifriz).

Any approach to the molecular kinetics of living matter has to recognize that a living cell (1) is the seat of a coordinated stream of a great variety of processes, and in this feature alone differs from any, even the most intricate, known inanimate compound process; (2) derives its general properties fundamentally from those of protein molecules and protein complexes, this being particularly true of the response to temperature; (3) represents in its structure a steadily changing field of multiple hydrogen and other weaker bonds holding together the protein molecules, which are easily disrupted and re-established; and (4) is also a seat of an equally complex system of resistances opposing free movements of molecules and ions, driven by the force of diffusion or any other force; and it is reasonable to suppose that the resulting limitation of speed of the molecules travelling across this field is one, and probably the main, factor responsible for the attunement of various biochemical processes towards a balanced self-maintaining whole of cellular life.

It cannot be hoped that any of the theories of chemical change put forward so far could completely account for this picture of a living cell, as none of them deals satisfactorily with the molecular resistance. This factor is demonstrated by the great reduction in the rate of the enzymes active in a cell compared with the same enzymes working *in vitro* (Barron; Fraser and Kaplan), and by the low rate of permeability compared with that of free diffusion. All concepts of chemical change are primarily derived from the collision theory of gas reactions. Definitely acceptable as the idea has become for the reactions taking place in gases and simple solutions, its application to enzyme reactions is not easy. Additional factors have to be taken into account, corresponding to the newly introduced terms in the relative equations that gain in complexity as they are modified to fit such complex processes. The most elaborate version of the formula of Arrhenius proposed by Eyring (cf. Glasstone *et al.*) contains not less than eleven constants to establish the relation between rate and velocity. Various

factors corresponding to the increased number of freedoms, to steric conditions, and to other probability circumstances, admitted in the modern kinetics of enzymatic processes (Sizer; Glasstone *et al.*; Johnson *et al.*) are an important concession on the part of the theory to the observable reality, but they are not yet sufficient, however, when applied to the molecular kinetics of the cellular processes themselves. Even if the study is simplified to a theoretical case of an enzyme surrounded by a diffusion barrier (Best), the attempt at a mathematical analysis ends in a tangle that can hardly encourage an experimental cytologist to follow the same path in search of sound conclusions.

In the light of modern statistical molecular mechanics, any molecular change, whether physical or chemical, is based upon a change in the energetic content of the molecules involved; a "potential barrier" has to be crossed by a molecule before the change can take place. In this sense, the rates of chemical change and of diffusion do not differ fundamentally, and the old biological controversy as to the "chemical" and "physical" basis of cellular processes has no theoretical ground. Consequently, one method of expressing the molecular resistance involved in cellular processes would be to determine the energy required to overcome it, and Arrhenius' formula should be applied. Unfortunately, even in the simplest processes involving molecular resistance, such as viscous flow of water and diffusion in water, in which the additional factors included in the modernized Arrhenius equation can play but a limited part, important differences between the observed and calculated figures occur, or important modifications in the value of  $E$  ( $\mu$ ) with temperature take place. The value of  $E$  in the viscosity of water gradually falls from 5,060 cal/mol at 0° C. to 2,800 cal/mol at 60° C., and the variation is explained by assuming that the hydrogen bridges add to the flow resistance at the lower temperatures (Glasstone *et al.*, p. 505). The figures for the diffusion rate of mannitol in water are 6,600 and 3,800 cal/mol respectively at the two corresponding temperatures. Thus the variation of  $\mu$  with temperature, that proved a source of misleading theories in biology in the past (cf. Bělehrádek 1928, 1929, 1930, 1932, 1935; Booj and Wolverkamp; Glasstone *et al.*, p. 200), would again become an embarrassing factor, should this method of quantitative analysis be adopted in connexion with the theory of the molecular resistance in cellular rate processes.

It will not be out of place here to recall that the kinetic theory of molecular processes underwent several important modifications in the past, and, as far as the effect of temperature is concerned, each of them was brought to the attention of biologists by the chemists; the main stages of the development are associated with the names of Van 't Hoff, Arrhenius and, most recent, Eyring. There are certain features common to these stages:—(1) they have been put forward at relatively immature and controversial stages of the respective theories; (2) they have been applied satisfactorily to the simplest biological processes on the borderline between biology and chemistry, such as haemolysis, fermentation, protein denaturation; but the agreement has been less good when more complex biological phenomena were examined; (3) a few biologists warned against the dangers of over-

simplifying the highly complex character of living systems and of paying insufficient attention to the resistance factor; (4) but many more accepted the new suggestions more or less unreservedly and, apart from an impressive amount of new descriptive information on the biological action of temperature, many of their ideas sooner or later proved unfounded or misleading.

As regards the last version, called the "theory of absolute rates," it is presented as a renewed approach rather than as a final concept in the monograph destined for the chemists (Glasstone *et al.*, Preface), but as a much more positive theory, to which the living systems are no exception, in another monograph addressed to the biologists (Johnson *et al.*, Preface; but cf. p. 23, third paragraph). Its application to biology has so far been concerned mainly with microorganisms, enzymes and the action of certain substances upon bacterial luminescence, and less with more complex biological phenomena. Its application in practical chemistry has revealed important discrepancies between the expected and observed rates, and the calculated rates "may be in error by a factor of from 10 to 100 or more" (Hougen and Watson). It is therefore doubtful whether the theory would be better suited for universal application in biology.

In view of the provisional character of any hypothesis put forward in support of the general kinetic theory, new developments can be expected from the study of the general properties of matter at and in the vicinity of 0° K. The chemical kinetic theory supposes that all rate processes—including life phenomena—arrive at a full stop at 0° K only. As regards life, this assumption can be easily proved to be false (see e.g. Bělehrádek 1929, 1935). As regards matter in general, "the naïve association of temperature with kinetic energy clearly becomes untenable" (Sir F. Simon).

In presence of such uncertainties and difficulties an attempt to approach the mechanism of the cellular rate processes from a different angle seems justified. It is proposed to use a simpler formula, which is equally derived from inanimate phenomena, but is primarily connected with viscosity, and may thus be found useful in studies of molecular resistance involved in protoplasmic reactions.

### c) Rate-temperature relation in cellular processes

At the time of the growing dissatisfaction of biologists with the current temperature-velocity formulae borrowed from chemistry, an equation was proposed (Bělehrádek 1926–1932) which fits experimental data on the rate of many simple biological reactions with more accuracy than the  $Q_{10}$ -rule and Arrhenius formula:

$$v_2/v_1 = (t_2 - \alpha/t_1 - \alpha)^b \quad (1)$$

$v$  being the reaction velocity,  $t$  the temperature in degrees centigrade,  $\alpha$  the temperature threshold, or specific zero point variable from case to case, and  $b$  a temperature coefficient. The ratio of two velocities thus is equal to the ratio of the two corresponding temperatures reckoned from a specific zero point, elevated to some power ( $b$ ). When  $b = 1$ , the equation is transformed into that of a linear relationship.

For easy calculation of the constants the logarithmic form is preferable:

$$b = \frac{\log v_2 - \log v_1}{\log (t_2 - a) - \log (t_1 - a)} \quad (2)$$

Thus, in plotting  $\log v$  against  $\log (t - a)$ , a straight line is obtained whenever the formula holds true. The slope of the line is determined by  $b$  which is the tangent of the corresponding angle.

The formula is not valid universally, but gives satisfactory results with a great number of data, furnished by many authors, on the rate of a variety of biological phenomena. As a rule, only value of  $b$  and  $a$  respectively is found where  $Q_{10}$  and  $\mu$  vary with temperature<sup>1</sup>. Some examples are listed in Table I (see further Bělehrádek 1929, 1930, 1932, 1935).

This equation was originally proposed as a merely descriptive means of expressing experimental data. But, with the comparison of accumulating results, it soon became apparent that the constants might have a theoretical meaning, for their variations in one and the same biological process often proved to be systematic. Factors such as age, thermal adaptation, water content, presence of salts and other substances, differences in pH, often affect the value of  $b$ ; and the explanation at hand is that the numerical value of  $b$  (and also of  $a$ ) is connected with the variations in the physico-chemical state of the protoplasmic phases involved in the reaction rather than with the specific chemical nature of the "underlying master reaction" that would determine the velocity of the given biological process.

The term "protoplasmic viscosity" was applied in the first version of

<sup>1</sup> Certain peculiarities of the equation must be pointed out. The values of  $a$  and  $b$  can be most easily determined graphically, by plotting  $\log v$  against  $\log (t - a)$  and tentatively varying the value of  $a$  until a straight line is obtained. This method obviously requires accurate experimental data, a sufficiently extensive range of temperatures, and frequent thermal points. With the degree of accuracy usual in biological figures, the determination of  $a$  and  $b$  is affected by an error. The value of  $a$  often oscillates two or three degrees around the most probable value; and the lower down on the thermometric scale  $a$  is situated, the greater is its variation, so that at  $a = -70^\circ \text{C}$ . variations of about  $\pm 5^\circ$  have to be regarded as normal. This inconvenience—analogue to that encountered e.g. in determining the melting points of certain organic substances—however, can be greatly reduced if the accuracy of the data is reasonably good and at least one of the experimental temperatures lies close to  $a$ . The value of  $b$ , depending on that of  $a$ , is affected accordingly but to a much lesser extent. Biologists need not be discouraged by these properties of the formula. Any one of the temperature-velocity formulae used in biology has its errors, often enhanced by the relatively low degree of accuracy of biological data. The corresponding degree of uncertainty affecting the value of  $\mu$  is hardly less. Apart from this, in using the equation of Arrhenius (and its new, more elaborate form proposed by Eyring) it is supposed that all biological processes reach a standstill at  $0^\circ \text{K}$  only, which is an assumption for which there is no evidence and against which there are many objections. On the contrary, the  $b$ ,  $a$ -rule locates the specific zero points of biological functions on the general thermal scale with some degree of precision.

this hypothesis to denote the factor supposedly limiting the velocity of biological processes, but it was used in a broader sense to cover the total cellular resistance, mechanical and electrical, opposing free diffusion of molecules and ions. To avoid confusion it is now thought preferable to reserve the original meaning of the term "protoplasmic viscosity" as it is understood in experimental cytology, and to adopt the term "protoplasmic molecular resistance" in relation to the theory propounded here. Potential links between the two properties are not thereby denied; the general rela-

Table 1. Values of  $\alpha$  and  $b$  in some biological processes.

Process	Species	$\alpha$ calc.	$\alpha$ obs.	$b$	Authority
Photosynthesis	<i>Prunus laurocerasus</i>	-10	—	1.91	Matthaei <sup>1</sup>
O <sub>2</sub> consumption	<i>Pseudomonas arsenoxidansquinque</i>	0	—	1.27	Turner and Legge
	<i>Bacillus cereus</i>	0	—	1.6	Ingram
	Rat, heart ventricle	0	—	1.78	Fuhrman <i>et al.</i>
Locomotion	marine amoebae	-2.2	-3.1	1.26	Pantin 1924 <sup>1</sup>
	<i>Locusta migratoria</i>	0	—	1.06	Chapman
Phototropic response	<i>Necturus maculosus</i>	-25	—	1.76	Cole <sup>1</sup>
Luminescence	<i>Vibrio phosphorescens</i>	-6	-6	3.21	Root
Reproduction	<i>Escherichia coli</i>	5	5	2.00	Barber <sup>1</sup>
	<i>Lactobacillus delbruecki</i>	20.2	20	1.40	Slator <sup>1</sup>
	<i>Tetrahymena geleii</i>	5.5	5.5	1.01	Phelps
Development	<i>Drosophila</i> (praepuppa)	8	—	1.05	Bliss
	<i>Rana sylvatica</i>	0	2.5	2.00	Moore
	<i>Rana pipiens</i>	0	3.5	2.3	Moore
Excystment	<i>Colpoda duodenaria</i>	5	—	0.31	Brown and Taylor <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Computed by the author.

tionship between viscosity of flow and rate of diffusion is to be retained as a directive in the first approximation. What matters, however, in effect is the resistance opposed within the submicroscopic protoplasmic phases and structures, and within the phase boundaries, where the underlying biochemical processes take place. The physical properties of such structures cannot easily be described in quantitative terms, as they cannot be measured by direct methods; but the molecular resistance they offer can be assessed indirectly. An example should be quoted here as an illustration. The value of  $b$  in some biological processes tends to increase with the temperature to which the species or individual is adapted (Bělehrádek 1931; Moore). The explanation offered is that the molecular resistance of the relevant protoplasmic phase is related to the consistency of the lipids participating in its structure, and thus to the melting points of lipids, which are known to rise with the temperature of their formation on thermochemical grounds. The idea gained support from comparative

studies of the properties of protoplasmic lipids in species characterized by different temperature requirements.

The theory that  $b$  is related to the molecular resistance is based on the fact that the temperature coefficient of viscosity in general increases with the viscosity itself (considered at a given temperature). At the time when the theory was first presented only a few scattered indications of this relationship were available, and the rule was formulated *ad hoc* (Bělehrádek 1926, 1929, 1930, 1932, 1935). Soon it received a theoretical basis derived from statistical molecular mechanics by Eyring (Glasstone); it can be demonstrated by the available viscosimetric data on homologous series of paraffins, sugar and gelatin solutions of increasing concentration, etc. The same relationship holds true for diffusion; in general, its temperature coefficient increases as its rate decreases.

#### d) The relationship between temperature and viscosity

The "viscosity of protoplasm," as determined by e.g. the centrifuge method, cannot be directly utilised to test the theory, since it refers to the viscosity of the liquid or semiliquid ground phase of cytoplasm. However, its study in this connexion may provide useful indications, general and

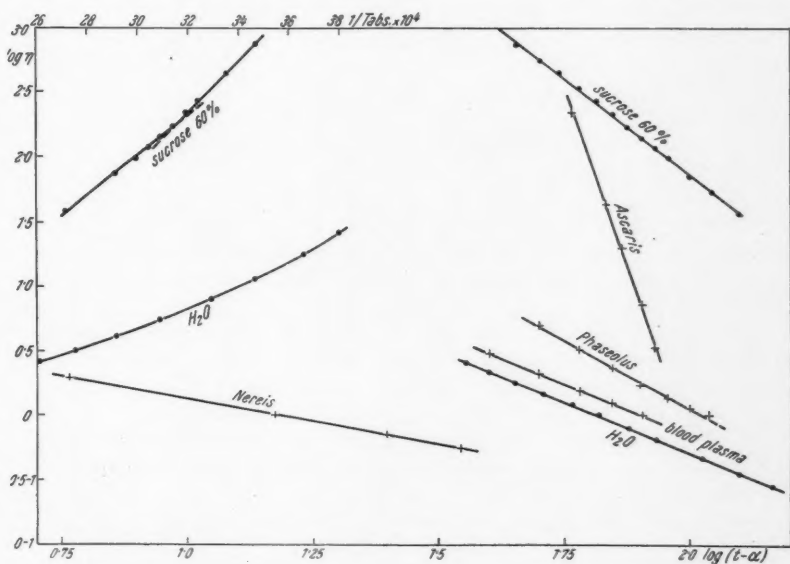


Fig. 1. Logarithmic values of viscosity plotted against  $\log (t - \alpha)$  give straight lines, in agreement with the equation of Slotte. Viscosity of water ( $10\eta$ ) and of sucrose solution are also plotted in Arrhenian representation (upper left, upper scale); the plots are not linear, and a "break" appears in the case of sucrose, although Slotte's formula gives one straight line (upper right).

indirect though they may be, of the thermal response of the cognate material out of which the submicroscopic protoplasmic constituents are built. Further indications can be obtained from analogy with the viscosity of liquids in general.

The question of a suitable formula presents itself first. So far the effect of temperature upon protoplasmic viscosity has been expressed in terms of  $Q_{10}$ , the numerical value of which, however, falls with increasing temperature as in biological processes in general. When Arrhenius' formula is applied to the data, as far as they are sufficiently regular and cover a reasonably extensive range of temperatures, it is found that the value of  $\mu$  is equally variable with temperature; only in the case of *Ascaris*

Table 2. Action of temperature upon viscosity.

Substance	Temperature range	$\alpha$	$b$	Source of data
Water . . . . .	-10 to 150	-46	1.53	Intern. Crit. Tables
NaCl, 0.5% . . . . .	0 to 100	-46	1.55	Intern. Crit. Tables
Sucrose, 20% . . . . .	0 to 85	-44	1.81	Bingham and Jackson
Sucrose, 40% . . . . .	0 to 95	-40	2.19	Bingham and Jackson
Sucrose, 60% . . . . .	0 to 95	-30	2.96	Bingham and Jackson
Gelatin, 2.5% . . . . .	25 to 60	0	1.20	J. Loeb
Peptone blood plasma .	0 to 40	-40	1.68	Snyder and Todd
Protoplasm:				
<i>Phaseolus multiflorus</i> .	0 to 60	-40	1.88	Weber and Weber
<i>Ascaris megalocephala</i> .	8 to 35	-40	9.16	Fauré-Fremiet
<i>Nereis</i> . . . . .	-0.7 to 30	-5	0.69	Pantin 1925

eggs (Fauré-Fremiet's data) is the value of  $\mu$  constant ( $\mu = 26,200 \pm 430$ ) between 8° and 35° C.

When the  $b, \alpha$ -rule is applied to the same sample of data, constant values of  $b$  and  $\alpha$  are invariably obtained for each group of data as shown in Fig. 1 and Table 2.

For comparison, the formula was also applied to the viscosity of flow in blood plasma and in gelatin solutions with a satisfactory result. It was equally found applicable to the viscosity of sugar solutions; and, as it was found valid even for the lowest concentration, it was applied to the viscosity of water, with a good agreement between -10° and 150° C. Then only it was discovered that the formula was mathematically identical with that proposed in 1881 by Slotte and tested by Thorpe and Rodger for the temperature-viscosity relationship of a great number of different substances in the liquid state, among them water.

The original form of this equation is

$$\eta = c/(a + t)^n, \quad (3)$$

$\eta$  being the viscosity at a given temperature  $t$  (in degrees centigrade), and  $c$ ,  $a$  and  $n$  being constants characterizing the individual liquids.

Let the lettering of the constants be modified for the purpose of this article, so that  $a$  becomes  $\alpha$ , and  $n$  becomes  $b$ :

$$\eta = c/(t + \alpha)^b \quad (4)$$

The value of  $b$  can be found if two viscosity values  $\eta_1$  and  $\eta_2$  at two temperatures  $t_1$  and  $t_2$  are known:

$$\frac{\eta_1}{\eta_2} = \left( \frac{t_2 + \alpha}{t_1 + \alpha} \right)^b \quad (5)$$

or

$$b = \frac{\log \eta_1 - \log \eta_2}{\log (t_2 + \alpha) - \log (t_1 + \alpha)} \quad (6)$$

The identity of this formula with equation (2) is apparent, since  $\eta$  represents time (whereas  $v$  is the reciprocal of time) and the difference in the sign of  $\alpha$  is irrelevant for reasons that will be evident later.

Identification of the  $b, \alpha$ -rule with the formula of Slotte is undoubtedly an additional argument in favour of the view that the rate of biological processes is closely related to a viscosity factor. The same result could doubtless have been obtained in a more direct way, had the formula been applied to protoplasmic viscosity immediately. However, the way in which the approach was made had the merit of being devoid of any preconceived idea; moreover, it provided an opportunity to establish the physical theoretical significance of  $\alpha$  ( $= \alpha$ ) that, as far as the author is aware, was lacking before. Thorpe and Rodger used the formula, until then only descriptive, with a view to relating the constants to the molecular properties, but did not succeed. They seem to have been unaware of the fact that  $\alpha$  represents the temperature threshold of viscous flow, as can now be concluded by analogy with the meaning of  $\alpha$  in biological rate processes.

This conclusion can be corroborated mathematically if, tentatively,  $t$  is made to equal  $-\alpha$ . The term  $(t + \alpha)^b$  then becomes  $(-\alpha + \alpha)^b$ , which equals zero. Consequently

$$\eta = c/0 = \infty. \quad (7)$$

In other words, the viscosity becomes infinite at a temperature equalling  $-\alpha$ . The meaning of  $c$  can be derived from the logarithmic shape of the formula

$$\log \eta_t = \log c - b \log (t + \alpha). \quad (8)$$

This equation can be simplified if  $t + \alpha = 1$ , or  $\log (t + \alpha) = 0$ , and consequently  $b \cdot \log (t + \alpha)$  also equals zero. The equation then becomes

$$\log \eta_t = \log c. \quad (9)$$

Thus  $c$  represents the viscosity at the temperature  $\alpha + 1$ ; and, as the numerical value of  $\alpha$  has a negative sign, this corresponds to a temperature lying one degree above  $\alpha$ . It is now obvious why it is merely a matter of convention whether  $\alpha$  is written with a positive or a negative sign. For instance, in the viscosity of water one can put either  $\alpha = -46^\circ \text{C.}$ , or  $-\alpha = 46$ . The former method is preferable as confusion might arise in certain cases in which the threshold temperature lies above zero centigrade.

The theoretical interpretation given here to the formula can be verified first of all by expanding further the analysis of Thorpe and Rodger's viscosimetric data. By replotting their figures in log-log representation straight lines are obtained in all instances except in certain higher alcohols in which the authors found two or three different values of constants for various sections of the temperature scale. The numerical value of  $\alpha$  lies well below  $0^\circ\text{C}$ ., as is normal for the viscosity of substances that are liquid at ordinary temperatures. Further, the value of  $\alpha$  does not exceed the lower limit of the general temperature scale ( $-273^\circ\text{C}$ .) as is to be expected in view of the thermometric dimension of the constant. Only in one instance, acetaldehyde, is  $\alpha = -286$ ; this, however, seems to be an accidental, rather than an exceptional, value since the relevant range of temperatures was only  $19^\circ$  in extent and consequently too narrow for a safe extrapolation.

The values of  $\alpha$  lie lower on the scale than the corresponding melting points. The "infinitely high viscosity value" associated with  $\alpha$  is not related therefore to the solid state attained by crystallization, but to that of the amorphous or vitreous state reached by gradually increasing the viscosity of a supercooled liquid by further cooling.

In attempting to check this conclusion on physical grounds one is struck by the paucity of exact data concerning the vitreous state in general (see e.g. Partington). Reliable and systematic data are lacking even for water and watery solutions (cf. Luyet and Gehenio). Solid amorphous water was produced on various rare occasions, the reported temperatures being  $-12$  to  $-20^\circ\text{C}$ . These figures apparently are not definite and the true vitrification of water probably occurs at considerably lower temperatures, as Luyet and Gehenio have observed amorphous solidification of sugar and dextrin solutions at  $-9.4$  and  $-40.6^\circ\text{C}$ . This uncertainty, owing to the metastable character of the vitreous state, is responsible for the lack of a sharply defined vitrification point, analogous to the critical melting point, but suggests rather a range of temperatures at which the vitreous state may be attained. If, therefore, the values of  $\alpha$ , theoretically computed for water and watery solutions, in the main lie lower than the scattered experimental figures so far available, this fact should not be held against the theory, as more precise and systematic data are needed. It should be remembered also that these figures have been assessed by the optical properties of supercooled droplets of water, too unreliable a method of evaluating the physical consistency of any substance. However, the agreement seems encouraging in the sugar solutions studied by Luyet and Gehenio.

By virtue of its definition the value of  $\alpha$  is affected by an operational factor: a supercooled liquid that will not longer flow under the pressure of its own weight when a certain low temperature is reached, can be forced to flow at a still lower temperature if additional force is applied. Viscosimetric data viewed from this angle therefore are comparable only inasmuch as they have been acquired by the same method and under the same driving force, unless a correction has been introduced.

Viscosities of various watery liquids as analyzed in Table 2 give  $\alpha$  and  $b$  values that are comparable with each other. Numerical values of  $b$  increase with the concentration, and thus with the specific viscosity, of sugar solutions, confirming the rule stated above: at the same time  $\alpha$  shifts upwards on the temperature scale. Further, all  $\alpha$  values are higher than that for water, as would be expected; in contrast, the values of  $\alpha$  for most of the organic liquids examined by Thorpe and Rodger lie between  $-100$  and  $-200^\circ\text{C}$ .

Nevertheless, three main conclusions can be drawn from their analysis, *viz.* (i) the equation of Slotte is applicable to the viscosity of the cytoplasmic ground phase; (ii) the respective constants are similar in magnitude to those found in watery solutions of organic substances, but they vary greatly with biological factors and probably are also affected by an operational factor so far neglected; and (iii) the "vitrification temperature" as represented by  $a$  does not seem to be simply related to the temperatures to which various species are adapted.

Of the data available on the permeability of living cells, those provided by Jacobs on mammalian blood cells and those by Wartiovaara on

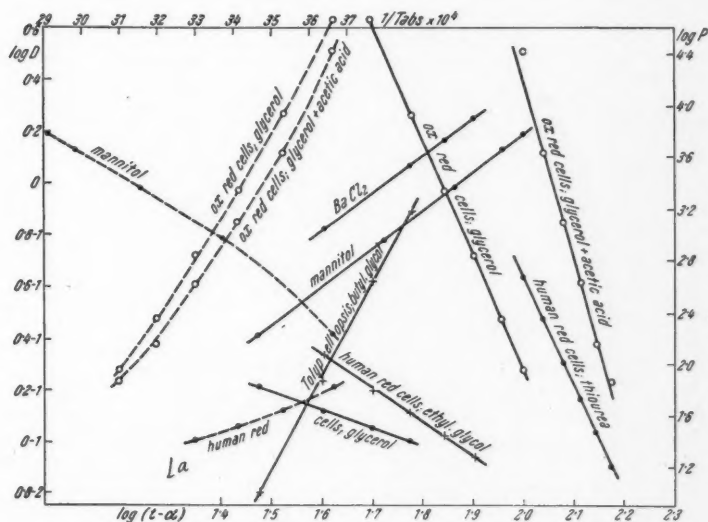


Fig. 2. Permeability of erythrocytes (as log times) and of *Tolypellopsis* (as log rates) plotted against  $\log(t-a)$  as required by Slotte's equation. Rate of diffusion ( $\log D$ ) of  $\text{BaCl}_2$  and mannitol in water are also represented. For comparison, some of the data are also given in the Arrhenius plot (log times, or rates, against  $1/T_{\text{abs}}$ : upper scale, dashed lines).

internodal cells of *Characeae* have proved suitable for handling by the  $b$ ,  $\alpha$ -rule; for the experimental techniques involved did not alter the normal conditions of permeability, and the range of temperatures was extensive enough. While, as stated by the authors, the values of  $Q_{10}$  and  $\mu$  are

Table 3. Action of temperature upon the rate of diffusion, osmosis, permeability, and electric conductivity.

Process	$\alpha$	$b$	Source of data
(a) Diffusion in water:			
NaCl, 0.05% . . . . .	-46	1.42	Int. Crit. Tables
KCl, 1% . . . . .	-40	1.40	
NH <sub>4</sub> Cl, 1% . . . . .	-30	1.06	
CaCl <sub>2</sub> , 1% . . . . .	-40	1.52	
MgCl <sub>2</sub> , 1% . . . . .	-40	1.52	
BaCl <sub>2</sub> , 1% . . . . .	-40	1.42	
Mannitol . . . . .	-30	1.50	Scheffer and Scheffer
(b) Osmosis:			
Cu-ferrocyanide membrane . . . . .	-150	3.9	Pfeffer
Testa, <i>Arachis hypogaea</i> . . . . .	-150	7.5	Denny
(c) Cell permeability:			
<i>Tolypellopsis (Characeae)</i> :			
Urethylan . . . . .	-40	4.65	Wartiovaara
Butylene glycol. . . . .	-30	7.16	
Tetramethylene glycol. . . . .	-30	6.72	
Hexamethylene tetramin . . . . .	0	3.42	
Human erythrocytes:			
Water . . . . .	-30	1.36	Jacobs <i>et al.</i>
Glycerol . . . . .	-30	1.36	
Glycerol + NaHCO <sub>3</sub> . . . . .	-150	4.15	
Ethylene glycol. . . . .	-40	2.56	
Urea . . . . .	-100	5.3	
Thiourea . . . . .	-100	13.3	
Erythritol . . . . .	-40	9.8	
Ox erythrocytes:			
Glycerol . . . . .	-50	8.6	Duyff
Glycerol + acetic acid . . . . .	-100	13.8	
Urea . . . . .	-100	3.1	
Electric conductivity:			
NaCl, 1 Mm . . . . .	-40	1.34	Duyff
Rabbit muscle . . . . .	-40	1.20	
Frog tongue . . . . .	-46	1.44	

affected by temperature, single values of  $b$  and  $\alpha$  suffice in each case, as is evident from the graph (Fig. 2) and indicated in Table 3. The magnitude of  $b$  within a given set of values on the whole varies inversely with the rate of permeability.

In view of the recognized analogies between cellular permeability and

diffusion, or "facilitated diffusion" (Danielli), it is interesting to try the same formula in a simple diffusion process. Diffusion of mannitol in water has been chosen, as the same data (Scheffer and Scheffer) have been used to test Eyring's theory; the variation of  $\mu$  with temperature in this case has been pointed out above. As is evident from Fig. 2, the data fit the b,  $\alpha$ -rule, giving  $\alpha = -30^\circ \text{C.}$ , a value consistent with that found for the viscosity of water, if the molecular dimensions are taken into consideration.

Diffusion of a number of salts in water has also been tested; values lie close to those valid for the viscous flow of water and weak solutions of

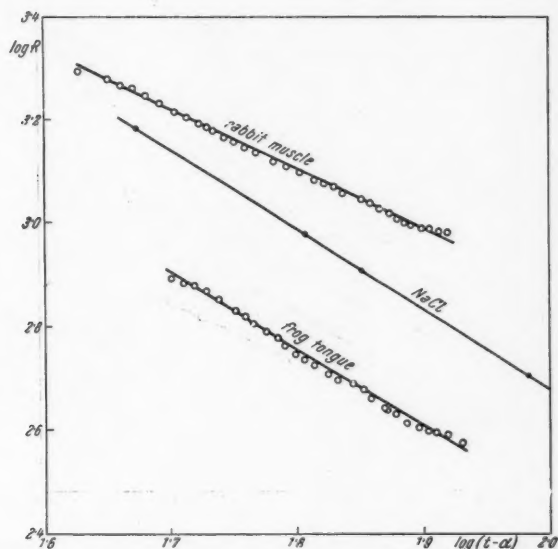


Fig. 3. Electric resistance of living tissues as a function of temperature reckoned from a specific threshold ( $\alpha$ ) in bi-logarithmic representation. Data of Duyff.—Resistance of a 0.116% solution of NaCl is represented for comparison.

crystalloids. However, the figures given here are provisional because of the relatively limited range of temperatures in the experiments.

The formula has also been tentatively applied to membrane diffusion. The values of  $\alpha$  lie considerably lower than that for the viscosity of water; in the light of the preceding analysis this might be due to the greater force involved in membrane osmotic diffusion compared with that involved in simple viscous flow, but no definite conclusion can be reached at this stage.

The formula holds good in the electric resistance of tissues, as can be shown by Duyff's data covering a large portion of the temperature scale (Fig. 3). Figures found for electric resistance of solutions are comparable with those computed for tissues (Table 3; Fig. 3).

## f) Enzyme action

Without any theoretical hypothesis in mind, the formula has been tried in various enzyme processes, and it was a surprise to find it applicable with the same or often even better degree of accuracy as the Arrhenius formula, as only on value of  $a$  and  $b$  is sufficient, where two or more values of  $\mu$  are necessary. The accuracy of the plot is shown in Fig. 4 and the numerical values of  $a$  and  $b$  are listed in Table 4. It will be noted that

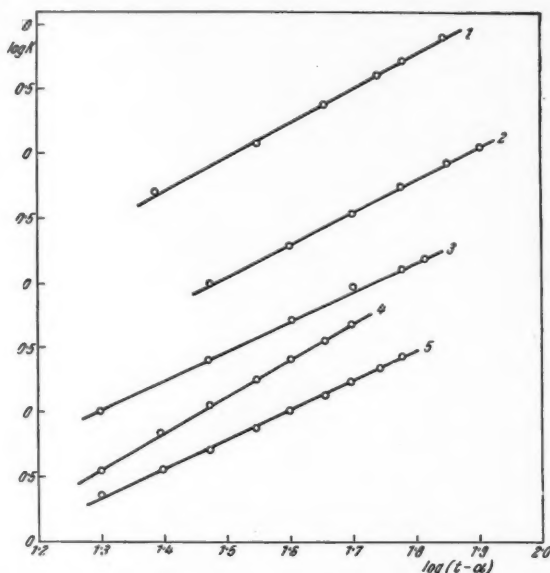


Fig. 4. Effect of temperature reckoned from a threshold  $a$  upon the rate of some enzymatic hydrolyses, in bi-logarithmic representation conformly to Slotte's formula. — 1: yeast invertase at pH=5.6 (Sizer); 2: crystalline urease (Poland); 3: pepsin (Ege); 4: trypsin (Butler); 5: cat bone phosphatase (Bodansky).

most of the enzymes obeying the formula are hydrolases; however, it would be premature to generalise at this stage.

From the results so far obtained, several conclusions can be provisionally drawn. The constants seem to be related to the configuration of the enzyme molecule, as they vary for example with pH, and as one and the same enzyme yields different constants when figures given by various authors are tested. A first tentative hypothesis offered (Bělehrádek 1954) is that the thermal response of an enzymatic process is based upon the degree of "uncoiling" of the enzyme molecule as a result of changes in the intramolecular, temperature-sensitive weak bonds, such as the hydrogen bridges. Too close a "coiling" in cold, and too loose an "uncoiling" in heat

reduce the activity; and the temperature optimum corresponds to the optimal coiling (cf. Kavanau).

The position of  $\alpha$  on the scale greatly varies, but is generally low. Although it rarely descends below the value characteristic of the viscosity

Table 4. *Action of temperature upon the rate of enzyme activity.*

Enzyme	$\alpha$	$b$	Source of data
Amylase (malt) . . . . .	-20	2.84	Ernstroem
Amylase (malt) . . . . .	- 5	1.94	Luers and Wasmund
Invertase . . . . .	-40	3.36	Kjeldahl
Invertase (yeast), pH = 5.6 . . .	-20	3.04	Sizer
Invertase (yeast), pH = 3.2 . . .	-30	3.04	Sizer
Maltase (yeast) . . . . .	0	0.96	Lintner and Kröber
Lipase (pancreas) . . . . .	-20	1.20	Kastle and Löwenhart
Lipase (liver) . . . . .	- 8	0.76	Kastle and Löwenhart
Trypsin . . . . .	-15	2.86	Butler
Trypsin . . . . .	- 3	2.80	Weis
Pepsin . . . . .	-20	2.36	Ege
Urease (crystalline) . . . . .	-30	2.20	Kistiakowski and Lumry
Urease (crystalline) . . . . .	-30	2.56	Poland
Phosphatase . . . . .	-15	2.22	Bodansky

of water, values as low as  $-60^{\circ}\text{C}$ . are occasionally encountered. Experimentally, certain enzymes have been found active at comparable temperatures (Sizer and Josephson). More experimental data of this kind are needed before these pointers can acquire a working hypothetical value.

### g) Discussion

Whatever takes place in a living cell takes place in a watery medium, and the particles involved are hydrated. Water molecules attached essentially by weak secondary valencies and hydrogen bridges coat the molecules and ions; they complete the configuration of dissolved protein molecules and also give to the enzyme molecules a structural pattern necessary for their activity. Molecules of reactants travelling across various phases of protoplasm carry a coating of water molecules that is ruptured before the chemical change occurs, and is reconstituted around the products. All intracellular movements of molecules and ions therefore take place in the presence of a frictional resistance exerted by water molecules, either free or bound to the hydrated particles, and either travelling or forming part of the less mobile, structural or "plastic" phases of protoplasm. The frictional resistance of free water molecules is relatively low and corresponds roughly to the viscosity of water in very narrow capillary spaces. It is high where water molecules cannot move freely owing to their stronger bondage with other molecules, especially protein molecules. It seems legitimate to suppose that in a cell there is a great variety of fields endowed

with their own "microviscosities" corresponding to diverse submicroscopic phases and phase boundaries, and that a cell constitutes a highly diversified system of molecular resistances based upon the distribution of highly heterogeneous microviscosity values. This picture differs from that currently applied to the rôle of water in cellular life; indeed, it has to be admitted that water is a more active, and a more variedly active participant in protoplasmic kinetics than would be expected from its generally accepted rôle as a universal, but merely passive, lubricant of the protoplasmic mechanism. In fact, water is often thought of as little more than a sort of protoplasmic ether corresponding to the empty space in gas kinetics. This is wrong, and the currently accepted distinction between "free" and "bound" water does not suffice to express the infinitely greater variety of states in which water is present in living matter.

On the whole,  $\alpha$  is situated higher on the scale in cellular processes than in enzyme reactions *in vitro*; and this is true of both the computed and observed values. This is in agreement with the now generally held attachment of enzyme molecules to the structural elements of protoplasm (Seifriz; Bensley; Barron; Mahler) that determine the conditions under which an enzyme works, e.g. surface adsorption (Fraser and Kaplan) or diffusion barriers (Best). In biological processes in which a relatively high (on the scale) value of  $\alpha$  is encountered, participation of protoplasmic lipids in co-determining the resistance barriers should be considered. Their melting point and therefore their consistency depend upon the temperature prevailing at the time of their formation, and this property has been advocated to explain the mechanism of thermal adaptation, as pointed out above (p. 58-59). Through their association with proteins they probably impart to lipoprotein complexes thermo-physical properties different from those characterizing the protein moiety alone.

The applicability of the formula to the action of certain enzymes is less surprising if it is borne in mind that the molecules of enzyme, substrate and products are also hydrated.

The concept of the molecular resistance of protoplasm as summarised in this paper and that of protoplasmic molecular energy as described by the formula of Arrhenius can be regarded as equally justifiable approaches to cellular kinetics which can be handled quantitatively in more than one way. Whether this is due to temporarily insufficient information in a relatively young subject, or whether cellular kinetics is one of the phenomena that can be treated in two different, but equally justifiable, ways remains to be seen.

### Conclusions

1. The formula originally suggested for the temperature-velocity relationship in simple biological processes has been found to be identical with Slotte's formula for the temperature-viscosity relationship in various liquids, including water and aqueous solutions.

2. This provides an additional argument in favour of the previously suggested hypothesis that the rate of biological processes is primarily

determined by protoplasmic resistance opposing free movement of molecules travelling within living matter, rather than by the rate of chemical change considered by itself.

3. By analogy with its meaning in biology, where it denotes the temperature threshold or specific thermal zero point of a process, the constant  $a$  in Slotte's formula can be given the meaning of the temperature threshold of viscous flow, that is the temperature at which a supercooled liquid assumes infinitely high viscosity, when in vitreous state. This conclusion is confirmed mathematically on the basis of the formula itself.

4. The formula also fits data on protoplasmic viscosity, cellular permeability and electric resistance of tissues; equally it fits data on the rate of diffusion in water, membrane dialysis and electric resistance of electrolyte solution.

5. Both the biological and the physico-chemical processes here shown to obey the formula of Slotte, are based upon the movement of hydrated particles in water or along other hydrated particles, and subject to frictional resistance between water molecules, either free or bound by various hydrating forces which may attain a high value in greatly reducing the mobility of water molecules so bound; the frictional resistance presumably varies accordingly.

6. Values of  $a$  in biological rate processes are never lower than  $-46^{\circ}\text{C}.$ , which is the value of  $a$  for the viscous flow of water, and thus the theoretical value of the solid vitrification temperature of water; they are often higher, as is also the case in the viscous flow of sugar solutions and gelatin solutions; participation of protoplasmic lipids in the determination of  $a$  in biological processes is discussed.

7. The formula has also been found valid in certain enzyme reactions in which the equation of Arrhenius gives a  $\mu$  varying with temperature; a tentative hypothesis is suggested.

#### References

- Barber, M. A., 1908: *J. Infect. Dis.* 5, 379.  
Barron, E. S., Guzman, 1943: *Biol. Symposia* (Lancaster, Pa., USA) 10.  
Bělehrádek, J., 1926: *C. r. Soc. Biol.* 95, 1449; *Nature* (Brit.) 118, 117.  
— 1926, 1927: *Nature* (Brit.) 118, Oct. 2; *C. r. Soc. Biol.* 96, 1423.  
— 1929: *Protoplasma* 7, 232.  
— 1930: *Biol. Rev.* 5, 30.  
— 1931: *Protoplasma* 12, 395, 406.  
— 1932: *Protoplasma* 16, 102.  
— 1935: *Temperature and Living Matter. Protoplasma Monographs VIII*, Berlin.  
— 1954: *Nature* (Brit.) 173, 70.  
Bensley, R. R., 1943, 1942: *Biol. Symposia* (Lancaster, Pa., USA) 10, 323; *Repr. from Science* (USA) 96, 389.  
Best, J. B., 1953: *J. cellul. a. comp. Physiol.* (Am.) 46, 1.  
Bingham and Jackson, 1919: *Bur. of Standards Bull.* No. 14, 59; quoted in: *Internat. Crit. Tables*, Vol. V.  
Bliss, Ch. J., 1926: *J. gen. Physiol.* (Am.) 9, 467.  
Bodansky, O., 1939: *J. biol. Chem.* (Am.) 129, 197.

- Booij, H. L., and H. P. Wolverkamp, 1944: *Bibl. Biotheoret.* 1, 145; Wolverkamp, H. P., and H. L. Booij, 1949: *Processus en chaine et facteurs limitatifs en biologie. Actualités biochimiques* 13.
- Brown, M. G., and C. V. Taylor, 1937: *J. gen. Physiol. (Am.)* 21, 475.
- Butler, J. A. V., 1941: *J. amer. chem. Soc.* 63, 2971.
- Chapman, R. F., 1955: *J. exper. Biol.* 32, 126.
- Cole, W. H., 1922: *J. gen. Physiol. (Am.)* 4, 569.
- Danielli, F. J., 1945: *Seventh Symposium, Colston Res. Soc., Colston Papers VII.*
- and H. Davson, 1935: *J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.)* 5, 495.
- Davson, H., and F. J. Danielli, *The Permeability of Natural Membranes.* Cambridge 1943.
- Denny, F. E., 1917: *Bot. Gaz.* 63, 373.
- Duyff, J. W., 1941: *Arch. néerld. Physiol.* 25, 621.
- Ege, R., 1925: *Z. physiol. Chem.* 143, 159.
- Ernstroem, E., 1922: *Z. physiol. Chem.* 119, 190.
- Fauré-Fremiet, E., 1913: *Arch. Anat. microsc.* 15, 435.
- Fraser, M. J., and J. G. Kaplan, 1955: *J. gen. Physiol. (Am.)* 38, 515.
- Fuhrman, G. J., F. A. Fuhrman, and J. Field, Jr., 1950: *Amer. J. Physiol.* 163, 642.
- Glasstone, S., K. J. Laidler, and H. Eyring, 1941: *The Theory of Rate Processes.* New York.
- Hougen, O. A., and K. M. Watson, 1947: *Chemical Process Principles.* New York.
- Ingram, M., 1940: *J. gen. Physiol. (Am.)* 23, 773.
- International Critical Tables of Numerical Data (Nat. Res. Council, and Nat. Acad. of Sci., USA). New York, 1927.
- Jacobs, M. H., H. K. Glassman, and A. K. Parpart, 1935: *J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.)* 7, 197.
- Johnson, F. H., H. Eyring, and M. J. Polissar, 1954: *The Kinetic Basis of Molecular Biology.* New York.
- Kastle, J. H., and A. S. Loewenhardt, 1900: *Amer. chem. J.* 24, 491.
- Kavanaugh, J. L., 1950: *J. gen. Physiol. (Am.)* 34, 193.
- Kistiakowski, G. B., and R. L. Lumry, 1949: *J. amer. chem. Soc.* 71, 2006.
- Lintner and Kroeber, 1895: *Ber. dtsh. chem. Ges.* 28, 1050.
- Loeb, J., 1925: *La Théorie des Phénomènes Colloïdaux.* Paris.
- Luers, H., und W. Wasmund, 1922: *Fermentforsch.* 5, 169.
- Luyet, B. J., and P. M. Gehenio, 1940: *Life and Death at Low Temperatures.* Normandy (Biodynamica), USA.
- Mahler, R. H., 1953: *Internat. Rev. Cytol.* 2.
- Matthaei, G. L. C., 1905: *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., B* 197, 47.
- Moore, J. A., 1942: *Biol. Bull. (Am.)* 83, 375.
- Pantin, C. F. A., 1925: *J. Marine Biol. Ass.* 13, 321. — *J. exp. Biol.* 1, 519.
- Partington, J. R., 1952: *An Advanced Treatise on Physical Chemistry.* London, New York and Toronto.
- Pfeffer, W., 1877: *Osmotische Untersuchungen.*
- Phelps, A., 1946: *J. exper. Zool.* 102, 277.
- Poland, 1953: *Cit. in Sumner and Sommers, Enzymes.* New York.
- Root, C. W., 1932: *J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.)* 1, 195.
- Scheffer, J. D. R., and F. E. C. Scheffer, 1916: *Proc. Acad. Sci. Amsterdam* 19, 148.
- Seifriz, W., 1942: *The Structure of Protoplasm.* Iowa State Univ. Press.

- Simon, Sir Francis, 1954: Low Temperature Physics (Symposium of the Brit. Assoc., Oxford). *Nature (Brit.)* 174, 770.
- Sizer, I. W., 1937: *J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.)* 10, 61.
- 1943: *Advances Enzymol.* 3, 35.
- and E. S. Josephson, 1942: *Food Res.* 7, 201.
- Slator, A., 1916: *J. chem. Soc.* 109, 2 T.
- Slotte, 1881, 1892: *Wiedenr. Ann. Physik, N. F.* 14, 13; *Beibl. zu den Ann. d. Physik u. Chem.* 16, 182.
- Snyder, Ch. D., and M. H. Todd, 1911: *Amer. J. Physiol.* 28, 161.
- Thorpe, T. E., and J. W. Rodger, 1894: *Phil. Trans. Roy. Soc., A* 185 (II), 397. A 185 (II), 397.
- Turner, A. W., and J. W. Legge, 1954: *Austral. J. biol. Sci.* 7, 479.
- Wartiovaara, V., 1942: *Ann. Bot. Soc. „Vannamo“ (Helsinki)* 16 (1).
- Weber, F., and G. Weber, 1916: *Ber. dtsh. bot. Ges.* 34, 836.
- Weis, 1903: *C. r. Lab. Carlsberg* 5, 133. (cit. *Int. Crit. Tables.*)

Gebilde zu betonen. Diese gehen aus Störungen des normalen Kristallisationsvorganges hervor, denn Umwandlungen können zwar in der Richtung der Bildung regelmäßiger Kristalle erfolgen, nicht aber umgekehrt.

Die Bezeichnung „somatoide Bildungsformen“ übernimmt Gicklhorn (1929) für geformte Farbstofffällungen im Plasma, die er unter gewissen Versuchsbedingungen beobachtete.

Interessante Angaben über gehemmte Kristallbildung von Farbstoffen macht auch Wagner (1929).

In neuester Zeit hat Küster (1951) — in einer seiner letzten Arbeiten — unsere Kenntnisse auf diesem Gebiet abermals durch eine große Zahl von Beobachtungen vermehrt. Er beschrieb außer den nun bereits bekannten Kristallniederschlägen vor allem Membranstrukturen, die bei dieser Behandlung zutage treten, wie z. B. Membranstreifungen bei *Allium cepa* und *Elodea canadensis* und Rahmenfärbungen (Bildungen von Kristallniederschlägen an den Rändern von Zellwänden bei Farblosigkeit des Binnenfeldes). Ferner schenkte Küster seine Aufmerksamkeit den zahlreichen Metachromasieerscheinungen, die bei Behandlung gefärbter Zellwände mit Salzlösungen zu beobachten sind. Auch hier gibt es wieder cytomorphologische Differenzierungen, wie etwa die besonders starke Metachromasie der Tüpfelschließhäute.

Werden gefärbte Zellwände hingegen nicht mit Nitraten, sondern mit Chloriden (z. B. KCl oder  $\text{CaCl}_2$ ) behandelt, dann kommt es nicht zur Entstehung differenzierter Gebilde, sondern die Membran wird diffus entfärbt. Dabei diffundiert aber der Farbstoff interessanterweise während eines bestimmten Zeitraumes nicht nach außen ab, sondern bleibt in dem Vorraum zwischen den ungefärbten Protoplasten und der Zellwand („Negativfärbung“ nach Borriß). Ähnliche Bilder können auch bei niedrigen  $\text{KNO}_3$ -Konzentrationen entstehen (Borriß 1937, Abb. 4). Höfler und Schindler (1953) sowie Hirn (1953) beobachteten solche Negativfärbung oder Vorraumfärbung auch bei Algenzellen. Hier kommt es übrigens auch bei Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$  zu kristallinen Niederschlägen (vgl. Höfler und Schindler 1953, Abb. 3). Wie bereits Borriß ausführt, erfordert die Tatsache der Negativfärbung die Annahme, daß die Zellwände für den im Vorraum gelösten Farbstoff schwer permeabel sind. Höfler und Schindler (1953) stellten fest, daß die von Brauner (1933) angenommene Verminderung der Membranpermeabilität durch eine Eisenspeicherung, wie sie in vielen *Desmidiaceen*-Membranen vorkommt (vgl. Höfler 1926), für die von ihnen untersuchten Objekte nicht zutrifft.

Die vorliegende Arbeit schließt sich vor allem an die Ausführungen von Borriß an, dessen Versuche nach verschiedenen Richtungen hin erweitert wurden. Ich untersuchte die Wirkung sehr verschiedener Salze auf Zellwände, die mit Methylenblau und einigen anderen Farbstoffen gefärbt worden waren, und verglich vor allem die Wirkung verschiedener Anionen sowie die Bedeutung des Lebenszustandes der Zellen für die besprochenen Phänomene.

An dieser Stelle sei es mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. Karl Höfler, Vorstand des Pflanzenphysiologischen Instituts, für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für die stete Hilfe und Förderung meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Ebenso gebührt mein Dank Herrn Assistenten Dr. Helmut Kinzel für seine rege Anteilnahme, für sein Interesse, das er meiner Arbeit stets entgegenbrachte, und für seine Beratung in allen chemischen Fragen.

Herrn Assistenten Dr. Walter Url danke ich herzlichst für die Herstellung der Photographien.

### Methodik der Versuche

Die folgenden Versuche wurden zum Teil mit den Innenepidermen von *Allium cepa*, zum Teil mit den Blatt- und Stengelepidermen anderer höherer Pflanzen durchgeführt.

Die von mir verwendeten Zwiebeln stammten aus dem Versuchsgarten des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität in Augarten. Die übrigen Pflanzen waren teils aus dem Glashaus des Instituts, teils aus einem Privatgarten in Sievering, oder Freilandmaterial der Umgebung Wiens. Ich verwendete unausgetriebene Zwiebeln und schnitt die Innenepidermis mit einer scharfen Rasierklinge in kleine Teile, die dann mit der Pinzette vorsichtig abgezogen wurden. Von den Epidermen der übrigen Pflanzen wurden dünne Flächenschnitte hergestellt.

Die Schnitte wurden sodann in ein kleines Schälchen gebracht, in dem sich die Farblösung befand. Es wurden meist Lösungen in einer Konzentration 1 : 1000 verwendet (10 mg Farbstoff auf 10 cm<sup>3</sup> dest. Wasser). Der Farbstoff wurde in destilliertem Wasser gelöst (pH 5,5–6,0). Die Färbezeit betrug meist 3 Minuten. Nach dieser Zeit war die Membran kräftig gefärbt.

Die Schnitte wurden hierauf kurze Zeit in destilliertes Wasser gelegt, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Dann brachte ich die Schnitte mit einer Pinzette auf den Objektträger, bedeckte sie mit einem Deckglas und saugte die Salzlösungen durch. Die Konzentrationen der Lösungen werden im experimentellen Teil immer in Mol/l angegeben.

Die Farbtöne wurden mit der kleinen Farbmeßtafel nach Ostwald, Ausgabe C (Franck'sche Verlagshandlung, Stuttgart-O.), bestimmt.

Die Photographien wurden teils mit Zeiss-Miflex-Aufsatzkamera auf Lumière-Lumichrome-Platten aufgenommen (und zwar die Nummern 1, 2, 3, 5, 8, 9, 10), teils mit Exakta Varex auf einem Adox-Kb 14-Film (Nr. 4, 6, 7, 11, 12).

### Vergleichende Versuche mit verschiedenen Neutralsalzen und basischen Farbstoffen

#### I. An *Allium cepa*

##### 1. Negativfärbung

Wie bereits erwähnt, hat schon Borriß (1937) festgestellt, daß bei Zellwänden, die mit KCl entfärbt wurden, in den Zellen keine distinkten Gebilde auftreten. Der Farbstoff bleibt im extraplasmatischen Raum einige Zeit hindurch gelöst (Negativfärbung, Vorraumfärbung).

Ich untersuchte noch eine große Zahl von Salzen und fand bei einer Reihe von ihnen das genannte Phänomen, nämlich bei Kaliumsulfat, gelbem Blutlaugensalz, Natriumfluorid, Ammoniummolybdat, Natriumphosphormolybdat.

Ebenso konnte ich mit allen untersuchten organischen Salzen, wie Seignettesalz, Natriumoxalat, Ameisensaurem Kalzium, Essigsäurem Natrium, Propionsäurem Natrium, Buttersäurem Natrium und milchsäurem Natrium, Negativfärbung erzielen. In keinem Fall entstanden innerhalb der Zellen kristallinische Niederschläge.

## 2. Versuche mit Methylenblau und Nitraten

A.  $\text{KNO}_3$ . — Zellen der Innenepidermis von *Allium cepa* wurden in Methylenblau 1 : 1000 angefärbt, die Membranen zeigen nach der kleinen Farbmestafel nach Ostwald den Farbton 13 pa.

Beim Durchsaugen einer 1 molaren  $\text{KNO}_3$ -Lösung ist eine deutliche Umfärbung zu sehen, und zwar zunächst in den Randzellen, dann über das ganze Präparat fortschreitend. Es ist überall eine deutliche blaurote Verfärbung zu erkennen (Farbton 11 pa). Diffuse blaue Wolken treten in den umgebenden Salztropfen aus, gleichzeitig treten aus der Zellwand unzählige dunkelblau gefärbte Tropfen aus, die sich in lebhafter BMB befinden. Diese Kugeln treten aus, noch bevor Plasmolyse erfolgt. Sie stoßen aneinander, fließen zusammen und werden dadurch bedeutend größer, dafür aber weniger zahlreich. Beim Zusammenfließen verlieren die Kugeln ihre runde Gestalt und werden zu unregelmäßig geformten Gebilden („Schollen“), die im Raum zwischen Zellwand und Protoplasten liegen (Abb. 1). Die Membran ist entfärbt, nur die Mittellamelle behält noch einen rotblauen Farbton.

Die Schollenbildung verläuft aber nicht in allen Zellen gleich schnell. In manchen Zellen sieht man z. B. noch ein typisches Tröpfchenstadium, während in der Nachbarzelle bereits Schollen liegen.

Nach 20–30 Minuten verlieren die Schollen ihre typische Blaufärbung; sie werden immer heller, verlieren schließlich ihre Umrisse und lösen sich auf.

Gleichzeitig mit diesem Vorgang beginnen sich über dem Schnitt blaue Kristallnadeln zu bilden, die in dem Maße wachsen, wie die Schollen verschwinden (vgl. Abb. 2), bis schließlich der gesamte Farbstoff in Form der über dem Schnitt liegenden Kristallspieße vorliegt (Abb. 3). Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei den Schollen um eine instabile Modifikation des Farbsalzes („Koazervate“ nach Borris), die nach bekannten physikochemischen Prinzipien in die stabile Modifikation übergehen.

Den ganzen Vorgang der Tröpfchen-, Schollen- und Kristallbildung kann man in jedem beliebigen Stadium rückgängig machen, indem man durch das Präparat einen Tropfen Wasser durchsaugt.

Bei niedrigeren  $\text{KNO}_3$ -Konzentrationen (0,8 mol, 0,6 mol, 0,5 mol) sind die gleichen Stadien zu beobachten, die man bei Behandlung mit 1 mol erhält. Nur dauert das Tröpfchenstadium, z. B. bei 0,6 mol, 15–20 Minuten.

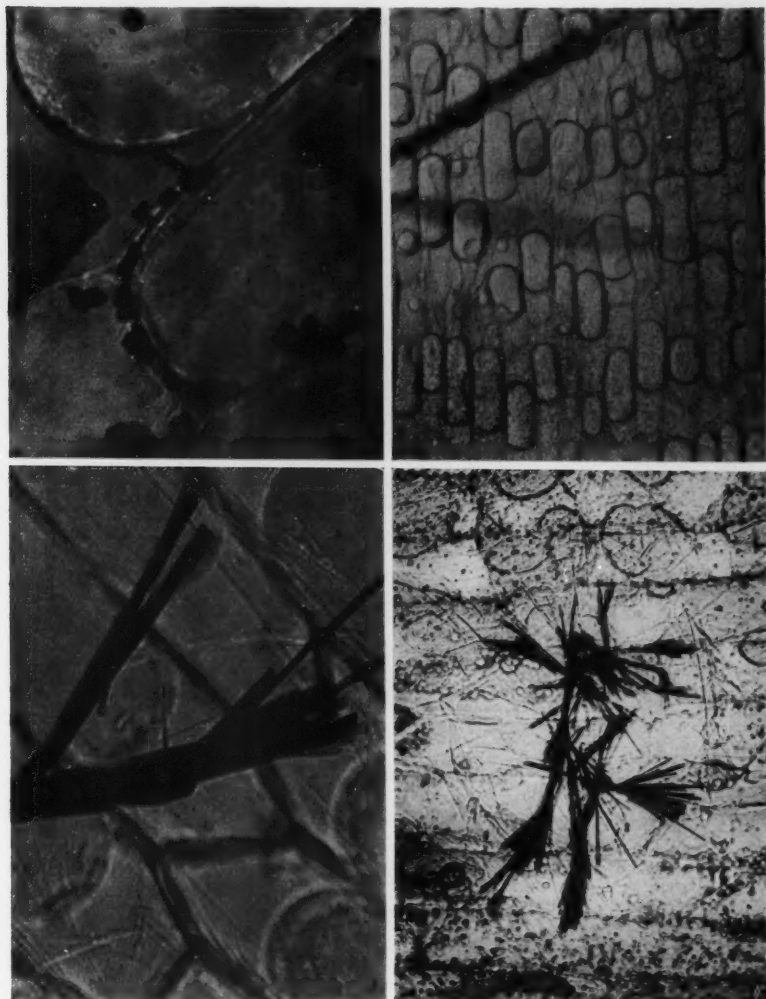


Abb. 1. Innenepidermis von *Allium cepa*, 3 Min. in Methylenblau 1 : 1000 gefärbt und dann mit 1 mol  $\text{KNO}_3$  behandelt. 10 Min. nach Versuchsbeginn.

Abb. 2. Innenepidermis von *Allium cepa*, 3 Min. in Methylenblau 1 : 1000 gefärbt und dann mit 1 mol  $\text{KNO}_3$  behandelt. 25 Min. nach Versuchsbeginn.

Abb. 3. Innenepidermis von *Allium cepa*, 3 Min. in Methylenblau 1 : 1000 gefärbt und dann mit 1 mol  $\text{KNO}_3$  behandelt. 35 Min. nach Versuchsbeginn.

Abb. 4. Innenepidermis von *Allium cepa*, 3 Min. in Methylenblau 1 : 1000 gefärbt und dann mit 1 mol  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  behandelt. 25 Min. nach Versuchsbeginn.

Erst nach dieser Zeit sind die Schollen sichtbar, und erst ungefähr  $1\frac{1}{2}$  Stunden nach dem Durchsaugen der Salzlösung sind die über den Zellen liegenden Kristalle zu sehen. Mit abnehmender Konzentration wird die Negativfärbung immer stärker. Während die Schollen bei abnehmender Salzkonzentration immer blasser, kleiner und undeutlicher werden, färbt sich der extraplasmatische Raum immer deutlicher an. Diese Färbung ist aber nicht beständig; der Farbstoff diffundiert mit der Zeit durch die Membran in den umgebenden Salztropfen und bildet dort die gleichen Kristallspeife, die sich aus den Schollen bilden. Bei 0,3 mol bilden sich keine Schollen mehr, sondern der gesamte Farbstoff ist diffus im sogenannten „Vorraum“. Bei Konzentrationen, bei denen keine plasmolytische Abhebung mehr erfolgt, entfärben sich die Zellwände diffus. In dem Schälchen, in dem der Schnitt in der Salzlösung liegt, sieht man deutlich die blauen Farbwolken. Bei mikroskopischer Betrachtung sieht man eine feine blaue Querstreifung der Membran (vgl. dazu Küster 1951, S. 260).

B.  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . — Saugt man durch das Präparat (Innenepidermis von *Allium cepa*, gefärbt in Methylenblau 1 : 1000, Färbezeit: 3 Minuten) anstatt der 1 molaren  $\text{KNO}_3$ -Lösung eine 1 molare  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung durch, so sind die einzelnen Stadien dieselben wie bei Verwendung von 1 mol  $\text{KNO}_3$ :

Neben einigen in den umgebenden Salztropfen austretenden Farbwolken schnellen aus der blaugefärbten Membran zahlreiche dunkelblau gefärbte Kugeln aus, noch bevor Plasmolyse eingetreten ist. Diese Kugeln befinden sich in lebhafter BMB, stoßen aneinander, stellen dabei ihre Bewegung ein und bilden „Schollen“, die deutlich blau gefärbt sind und im Raum zwischen Membran und Protoplasten liegen.

Nach ungefähr 25 Minuten verlieren die Schollen langsam ihre Farbe und lösen sich allmählich auf. Es bilden sich die über dem Präparat liegenden Kristallnadeln, die in dem Maße wachsen, wie die im extraplasmatischen Raum liegenden Schollen verschwinden.

Abb. 4 zeigt deutlich solche über dem Präparat gelegene Kristallnadelbüschel. In einigen Zellen sind noch die Schollen vorhanden.

### 5. Versuche mit Methylenblau und Bromiden

Verwendet man anstatt der  $\text{KNO}_3$ -Lösung eine 0,7 molare KBr-Lösung, so sind die einzelnen Anfangsstadien die gleichen wie bei  $\text{KNO}_3$ -Behandlung: die Zellwand verfärbt sich metachromatisch (Farbton 9 ia) und das Tröpfchenstadium ist dem schon beschriebenen sehr ähnlich. Der Unterschied gegenüber  $\text{KNO}_3$  wird beim Aneinanderstoßen der Kugeln deutlich. Sie ziehen sich zu länglichen Gebilden aus, die untereinander durch feine Fäden verbunden erscheinen und ein zusammenhängendes Netzwerk bilden (vgl. Abb. 5), das nach der Ostwaldschen Farbtafel den Farbton 8 ie hat. Hier gibt es in den Zellen keine isolierten Kugeln und Schollen, sondern die Aggregate sind perlschnurartig aufgereiht. Ein weiterer auffälliger Unterschied gegenüber  $\text{KNO}_3$  ist die Stabilität der KBr-Muster. Während die Schollen zugunsten der über dem Präparat liegenden Kristallnadeln verschwinden, stellen die KBr-Aggregate offenbar eine stabile Form des

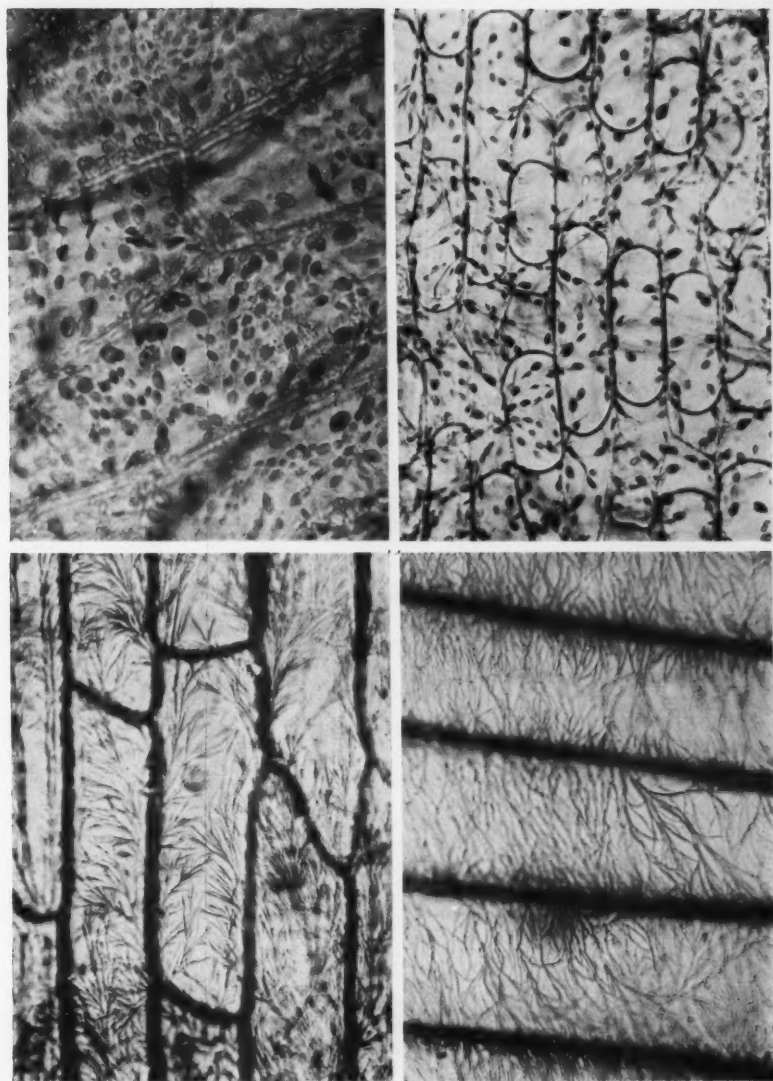


Abb. 5. Innenepidermis von *Allium cepa*, 3 Min. in Methylenblau 1 : 1000 gefärbt und dann mit 0,7 mol KBr behandelt. 5 Min. nach Versuchsbeginn.

Abb. 6. Innenepidermis von *Allium cepa*, 3 Min. in Methylenblau 1 : 1000 gefärbt und dann mit 1,0 mol KBr behandelt. 5 Min. nach Versuchsbeginn.

Abb. 7. Innenepidermis von *Allium cepa*, 3 Min. in Methylenblau 1 : 1000 gefärbt und dann mit 0,4 mol KJ behandelt. 10 Min. nach Versuchsbeginn.

Abb. 8. Innenepidermis von *Allium cepa*, 3 Min. in Methylenblau 1 : 1000 gefärbt und dann mit 0,6 mol KCNS behandelt. 10 Min. nach Versuchsbeginn.

Farbsalzes dar, denn sie sind noch nach Wochen unverändert erhalten. Es bilden sich zwar über dem Schnitt einige Kristallnadeln, doch dürften diese nur von einer geringen Menge Farbstoff herrühren, die zu Anfang des Versuches nach außen abdiffundiert. Diese Kristallnadeln werden auch bei Liegenbleiben in der Salzlösung nicht mehr größer. Ein weiterer sehr auffälliger Unterschied gegenüber der  $\text{KNO}_3$ -Behandlung liegt in der verschiedenen Abhängigkeit des Vorganges von der Salzkonzentration. Bei  $\text{KNO}_3$  tritt die Schollenbildung desto kräftiger und schöner ein, je konzentrierter die Salzlösung ist. In der höchsten verwendeten Konzentration (2 mol) war sie am deutlichsten sichtbar. Bei KBr hingegen liegt das Optimum bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen (0,7 mol). Bei höherer Konzentration sind die Aggregate wohl größer, dafür aber weniger zahlreich (Abb. 6).

In Konzentrationen unterhalb 0,4 mol bilden sich weder gefärbte Gebilde, noch zeigt sich die Erscheinung der Metachromasie. Zwischen 0,3 und 0,1 mol entfärbt sich die Membran erst nach längerem Liegen in der Salzlösung. Der Farbstoff tritt diffus aus und hinterläßt die Membran ungefärbt.

Ebenso wie KBr verhält sich auch  $\text{CaBr}_2$ . Es zeigt sich auch hier deutlich, daß bei der Aggregatbildung die Anionen wirksam und daß die Kationen ohne Einfluß sind.

Auch bei Bromiden lösen sich beim Durchsaugen von Wasser die Aggregate auf, und der Farbstoff wird wieder von der Zellwand aufgenommen. Obwohl  $\text{KNO}_3$  und KBr gewisse Unterschiede in ihrer Wirkung zeigen, so lassen sie sich doch im wesentlichen zu einem einheitlichen Typus zusammenfassen, dem in den beiden Salzen KJ und KCNS ein ganz anderer Typus der Wirkung auf gefärbte Zellwände gegenübersteht.

#### 4. Versuche mit Methylenblau und KJ

Die Konzentration von 1 mol KJ ruft eine starke metachromatische Verfärbung der Membran hervor (Farbton 10 pc). Im allgemeinen entstehen bei 1 mol weder distinkte Gebilde in den Zellen noch tritt eine diffuse Entfärbung der Zellwand auf. Das Ergebnis ist leicht erklärbar:

Setzt man auf dem Objektträger zu einem Tropfen Methylenblaulösung einen Tropfen einer 1 molaren KJ-Lösung zu, so tritt augenblicklich eine kristallinische Fällung auf. Ebenso dürfte auch innerhalb der Zellwand eine solche Fällung in submikroskopischen Dimensionen stattfinden, womit vielleicht auch die Stärke der Metachromasie zusammenhängt. Außerhalb der Zellen liegen meist einige Kristalle, deren Entstehung sich aus oberflächlich anhaftendem Farbstoff erklärt.

Bei schwächeren Konzentrationen bilden sich auch hier bestimmte sichtbare Körper in den Zellen aus, aber niemals in Form der unregelmäßigen Schollen oder Muster wie bei  $\text{KNO}_3$  bzw. KBr. Hier entstehen die Bildungen immer in kristalliner Form. Es handelt sich hier um zarte, verzweigte „Fächer“ oder Kristallbüschel, die ebenso wie die Zellwände metachromatisch verfärbt sind (Abb. 7).

Bei 0,03 mol KJ bilden sich erst nach 10 Minuten Liegen in der Salzlösung schöne breite Fächer von rotlila Farbe aus. Ab 0,02 mol tritt keine Metachromasie mehr auf, die Zellwände behalten ihre ursprüngliche blaue Farbe. Auch nach längerem Liegen in der Salzlösung erfolgt weder Membranverfärbung noch Musterbildung. Der Lebenszustand der Zelle wurde in allen Fällen durch Plasmolyse überprüft.

Aus den Versuchen geht hervor, daß mit KJ überhaupt keine Entfärbung der Zellwand im eigentlichen Sinn zu erreichen ist. Bei hoher Konzentration wird der Farbstoff in Form eines submikroskopischen Niederschlages ausgefällt. Bei mittleren Konzentrationen bilden sich der Innenseite der Zellwand angelagerte Kristallaggregate, bei schwachen Konzentrationen behält sie ihre ursprüngliche Färbung. Diese Erscheinungen ändern sich auch bei langem Liegen in der Salzlösung nicht mehr.

### 5. Versuche mit Methylenblau und KCNS

Die durch KCNS hervorgerufenen Erscheinungen sind dem durch KJ verursachten Bildungen in vielem sehr ähnlich. Bei Konzentrationen von 2 mol bis 0,5 mol tritt sehr starke Metachromasie auf (Farbton 10 na beim Durchsaugen von 1,0 mol), es entstehen aber keine kristallinen Niederschläge. Wie bei KJ dürften auch hier submikroskopische Fällungen in den Zellwänden auftreten. Auf dem Objektträger flockt der Farbstoff sofort nach Zusatz einer KCNS-Lösung (in stärkerer Konzentration) aus.

Erst bei 0,6 mol KCNS treten an der Innenseite der Membran (Farbton 12 pc) verzweigte Kristallbüschel auf (Abb. 8), die den Farbton 11 pa aufweisen.

Die Zellwände sind metachromatisch verfärbt, jedoch bei weitem nicht mehr so stark wie bei höheren Konzentrationen. Hier überwiegen nicht die rotvioletten Farbtöne, sondern es herrscht eine blaulila Färbung vor. Auch die Kristallnadeln zeigen diese mehr blauen Farbtöne.

Metachromasie erfolgt bis zu einer Konzentration von 0,1 mol KCNS, Bildung der Kristallnadeln bis zu 0,1 mol. Sie haben bei diesen tiefen Konzentrationen die gleiche blaue Farbe wie die Zellwand, die sich niemals vollständig entfärbt. Zwischen 0,09 und 0,01 mol KCNS treten die Kristallnadeln in der Häufigkeit zurück, dafür sind aber zahlreiche kleine kompakte Kristalle sichtbar.

Läßt man Präparate, in denen Kristalle entstanden sind, längere Zeit (mehrere Stunden) liegen, so bleiben diese nicht, wie es bei KJ der Fall ist, unverändert liegen, sondern bilden sich zu anders geformten Kristallen um, die über dem Präparat liegen. Diese haben oft auch die Gestalt von „Doppelpinseln“.

Wir haben es bei den zunächst in der Zelle entstehenden Kristallen wieder mit einer instabilen Modifikation zu tun. Wie bei  $\text{KNO}_3$ -Behandlung die Schollen sich zu den Kristallspeichen umbilden, so sind hier die Kristallnadeln die primäre Form; aus ihnen entstehen die doppelpinselartigen Kristallbüschel.

### 6. Versuche mit Methylenblau und $K_2CrO_4$

Eine dritte Art der Wirkung auf gefärbte Zellwände ruft  $K_2CrO_4$  hervor. 1,0 mol bewirkt Negativfärbung und gleichzeitig entstehen an der Zellwand kleine Kristalle, die bäumchenartig aussehen und zum Teil an kurzen Stielen sitzen (Abb. 9). Manche Zellen sind normal plasmolysiert, manche zeigen Tonoplastenstadien. Die Tonoplasten haben einen Teil des Farbstoffes aufgenommen und zeigen blaue Färbung. Diese Erscheinung wurde bereits von Höfler (1952) eingehend studiert. Er zeigte, daß die Tonoplasten ionenpermeabel sind.

Ich fand, daß die Kristallbüschel ihre untere Entstehungsgrenze bei 0,09 mol  $K_2CrO_4$  haben. Sie stellen eine stabile Form dar, denn sie bleiben in den mit Vaseline umrandet aufbewahrten Präparaten erhalten.

### 7. Versuche mit Toluidinblau

Nicht nur die mit Methylenblau gefärbte pflanzliche Zellwand gibt nach Salzzusatz verschiedenartige Aggregatbildungen im Inneren der Zelle. Auch Toluidinblau ergibt eigenartige Niederschläge.

Setzt man einem Präparat, das mit Toluidinblau in einer Konzentration 1 : 1000 (gelöst in dest. Wasser) 3 Minuten lang gefärbt wurde, einen Tropfen einer 1 molaren  $KNO_3$ -Lösung zu, so treten aus der Membran verschieden geformte Aggregate aus: wurmförmige, korkzieherartige, gedrehte, gewundene und schraubenförmige Gebilde (Abb. 10).

Diese Gebilde liegen zwischen Membran und Protoplasten und stellen eine stabile Modifikation von Toluidinblau und  $KNO_3$  dar. Sie verändern ihre Form auch nicht nach längerer Zeit, sie bleiben unbegrenzt erhalten. Auch hier wurde der Lebenszustand der Zellen in keiner Weise beeinträchtigt, sie zeigen normale Plasmolyse.

Auch KBr bewirkt eine Entfärbung der mit Toluidinblau gefärbten Membran und zeigt in der Zelle die verschiedensten Niederschläge: Kügelchen, Scheibchen, Blättchen, Stäbchen, Stiftchen etc. (Abb. 11).

Diese Aggregate sind aber nicht stabil. Nach ungefähr  $\frac{1}{2}$  Stunde sind die meisten verschwunden; sie haben sich zu größeren runden Gebilden vereint. Diese dürften aber nicht so wie bei  $KNO_3$  über dem Präparat liegen, sondern wie die Scheibchen und Stiftchen selbst im Raum zwischen Zellwand und Protoplasten (Abb. 12).

### 8. Versuche mit Neutralrot

Färbt man die Zellwand mit Neutralrot an (pH 3,45) und setzt dann dem Präparat eine 1 molare  $KNO_3$ -Lösung zu, so entfärbt sich die Membran und es treten aus ihr lila gefärbte Kugeln aus, die sich in lebhafter BMB befinden, also ein Vorgang, der sich auch bei Methylenblaufärbung und  $KNO_3$ -Zusatz abspielt. Inzwischen erfolgt Plasmolyse und auch der Vorraum zeigt eine Rotfärbung. Die Kügelchen stoßen aneinander, werden größer und vereinigen sich zum Unterschied gegenüber Methylenblau nicht zu Schollen, sondern lösen sich nach wenigen Minuten auf und bilden Kristalle,

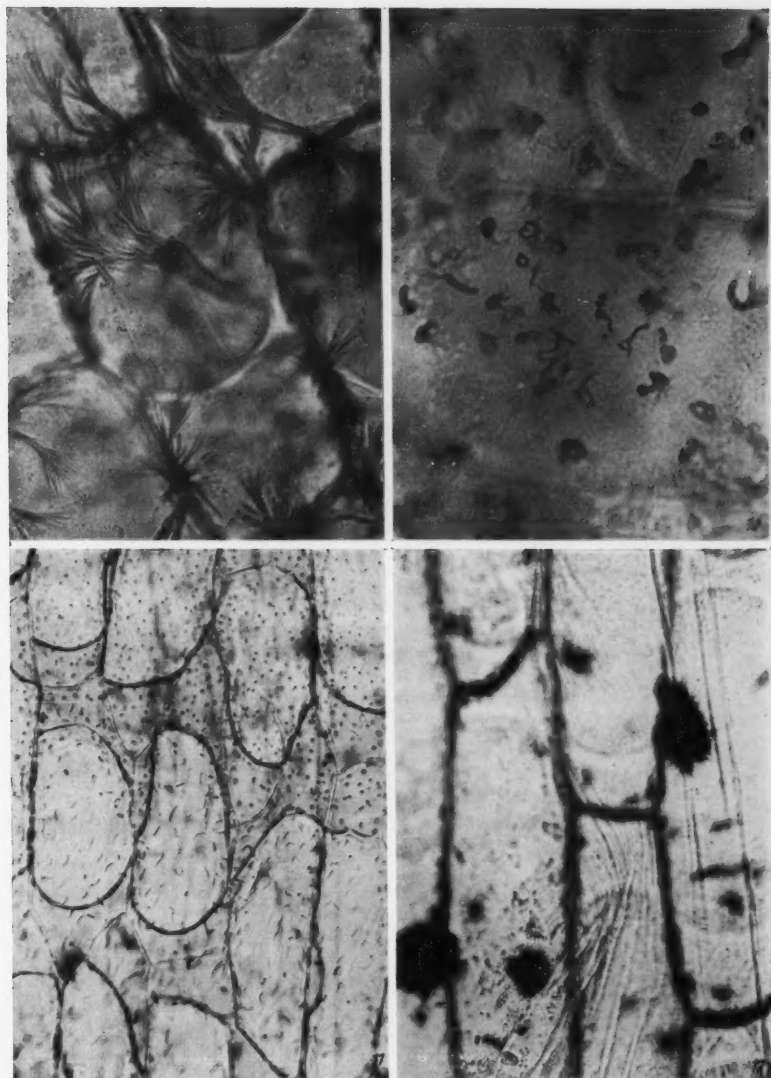


Abb. 9. Innenepidermis von *Allium cepa*, 5 Min. in Methylenblau 1 : 1000 gefärbt und dann mit 1 mol K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> behandelt. 15 Min. nach Versuchsbeginn.

Abb. 10. Innenepidermis von *Allium cepa*, 5 Min. in Toluidinblau 1 : 1000 gefärbt und dann mit 1 mol KNO<sub>3</sub> behandelt. 15 Min. nach Versuchsbeginn.

Abb. 11. Innenepidermis von *Allium cepa*, 5 Min. in Toluidinblau 1 : 1000 gefärbt und dann mit 1 mol KBr behandelt. 15 Min. nach Versuchsbeginn.

Abb. 12. Innenepidermis von *Allium cepa*, 5 Min. in Toluidinblau 1 : 1000 gefärbt und dann mit 1 mol KBr behandelt. 30 Min. nach Versuchsbeginn.

die über dem Präparat liegen. Neutralrot und  $\text{KNO}_3$  bilden also in der Zelle keine festen Aggregate.

Ebenso wie  $\text{KNO}_3$  verhält sich auch  $\text{KBr}$ ; auch dieses Salz vermag mit Neutralrot in der Zelle keine festen Gebilde hervorzurufen.

Mit  $\text{KJ}$  und  $\text{KCNS}$  ist überhaupt keine vollständige Entfärbung zu erzielen.

So wie *Allium cepa* verhielten sich auch andere Objekte, deren Zellwände mit Neutralrot angefärbt wurden, nämlich die unteren Blattepidermen folgender Objekte: *Cyclamen europaeum* und *persicum*, *Euphorbia splendens* und *Hedera helix*.

Beim Durchsaugen einer 1 molaren  $\text{KNO}_3$ -Lösung durch ein mit Neutralrot vorgefärbtes Blättchen von *Elodea canadensis* entfärbten sich wohl die Zellwände in der für Neutralrot charakteristischen Weise, nicht aber entfärbten sich die Blättzähne. Diese behalten die Farbe unbegrenzt; auch nach längerem Liegen in der Salzlösung verändert sich der Farbton nicht (vgl. dazu auch Molisch 1909, Gicklhorn 1927, Arens 1937, Küster 1937, Schönleber 1937, Lepke 1951).

#### 9. Versuche über die Abhängigkeit der Schollenbildung vom physiologischen Zustand der Zellen

Während die Entstehung der kristallinen Bildungen, hervorgerufen durch Methylenblaufärbung und nachfolgende Behandlung mit  $\text{KJ}$ - und  $\text{KCNS}$ -Lösungen, noch eher verständlich erschien, tauchte bei den offenbar kolloidalen metastabilen Schollen- und Musterbildungen ( $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KBr}$ ) die Frage auf, ob diese Bildungen etwas mit dem Lebenszustand der Zellen zu tun haben.

Es ließ sich in sehr vielen Fällen beobachten, daß kurz nach dem Durchsaugen der  $\text{KNO}_3$ -Lösung die entstandenen Schollen peripher in der Zelle liegen, also an der Innenseite der Membran. Nach 10–15 Minuten zogen sie näher an den Protoplasten heran und waren schließlich diesem angelagert, bis sie endlich in die stabile Form übergingen.

Es fragte sich nun, ob die Schollenbildungen, die offenbar mit den Protoplasten in eine irgendwie geartete Wechselwirkung treten können, etwa nur in lebenden Zellen entstehen. Es wurden daher auch Entfärbungsversuche mit vorplasmolysierten und auf verschiedene Art und Weise getöteten Zellen durchgeführt.

##### A. Versuche mit vorplasmolysierten Zellen

###### a) Innenepidermis von *Allium cepa*.

Die Zellen wurden gleichzeitig gefärbt und plasmolysiert, damit beim Durchsaugen der  $\text{KNO}_3$ -Lösung der Protoplast von der Zellwand abgehoben ist und ein Mitziehen der Schollen durch ihn nicht in Frage kommt.

Dazu wurden auf  $10 \text{ cm}^3$  einer 1 molaren  $\text{TRZ}$ -Lösung 10 mg Methylenblau zugesetzt, damit die Farbstoffkonzentration aufrecht bleibt. Saugte man nun durch das Präparat eine 1 molare  $\text{KNO}_3$ -Lösung durch, so konnte man hier alle Vorgänge ebenso wie bei nicht mit  $\text{TRZ}$  vorplasmolysierten Zellen genau beobachten: zuerst verfärbten sich die Membranen der Randzellen, bald auch die der übrigen Zellen.

Aus den Zellwänden traten in großer Zahl blau gefärbte Kugeln aus, die sich in lebhafter BMB befanden. Beim Zusammenfließen wurden die Kugeln bedeutend größer, verloren dabei aber ihre runde Gestalt und bildeten Schollen. Diese Schollen waren zunächst ebenso peripher gelagert wie in nicht vorplasmolysierten Zellen. Erst nach einiger Zeit ballten sie sich nach der Mitte zusammen, um schließlich in dem Maße kleiner zu werden, als der über den Zellen liegende Kristallspieß wuchs. Schließlich verschwanden die Schollen ganz aus dem Inneren der Zellen.

b) Innenepidermis von *Allium cepa*.

Die Zellwände wurden wieder gleichzeitig mit einer Methylenblaulösung 1 : 1000 angefärbt und mit 1 mol TRZ plasmolysiert.

Beim Durchsaugen der 1 molaren KBr-Lösung war der Protoplast, so wie im vorigen Versuch, von der Zellwand abgelöst und eine Beeinflussung der Aggregatbildung durch das Plasma kam nicht in Frage.

Auch bei diesem Versuch waren alle Einzelheiten der Musterbildung die gleichen wie in nicht vorplasmolysierten Zellen: beim Durchsaugen der Salzlösung färbten sich die Zellwände um und es traten aus ihnen zahllose blaue Kügelchen aus, die sich beim Aneinanderstoßen zu länglichen Gebilden auszogen. Diese waren untereinander durch feine Fäden verbunden und bildeten ein zusammenhängendes Netzwerk, welches in dieser Form im sogenannten „extraplasmatischen Raum“ erhalten blieb.

c) Innenepidermis von *Allium cepa*.

Die Zellen wurden in gleicher Weise wie in den Versuchen 1 und 2 gefärbt und gleichzeitig vorplasmolysiert und dann mit einer KJ-Lösung behandelt.

Sie zeigten keine Abweichungen gegenüber nicht vorplasmolysierten Zellen.

d) Innenepidermis von *Allium cepa*.

Die Zellen wurden gleichzeitig mit TRZ vorplasmolysiert und mit einer Methylenblaulösung 1 : 1000 gefärbt.

Beim Durchsaugen von KCNS wurden die Zellwände metachromatisch und an ihrer Innenseite bildeten sich die für KCNS typischen verzweigten Kristallbüschel.

Aus allen diesen Versuchen mit gleichzeitig mit Methylenblau gefärbten und TRZ vorplasmolysierten Zellen geht hervor, daß nach dem Zusatz der entsprechenden Salzlösungen innerhalb der Zelle die gleichen Bildungen zu beobachten sind wie in nicht vorplasmolysierten und mit dem entsprechenden Salz behandelten Zellen.

## B. Versuche mit auf verschiedene Art und Weise getöteten Zellen

Es wurde ferner untersucht, ob etwa die Schollen, die nach  $\text{KNO}_3$ -Behandlung entstehen, als kolloidale Bildungen, als die man sie ansprechen kann, sich nur in der lebenden Zelle bilden, und ob vielleicht nur die durch KJ und KCNS hervorgerufenen Kristallaggregate unabhängig vom Lebenszustand der Zelle sind.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden verschiedene Versuche unternommen:

a) Es wurden Membranen von Objekten ohne lebenden Zellinhalt (*Holundermark*, *Sonnenblumenmark*) 3 Minuten lang in einer Methylenblaulösung 1 : 1000 gefärbt und dann mit verschiedenen Salzlösungen behandelt.

Beim Durchsaugen einer 1 molaren  $\text{KNO}_3$ -Lösung verfärbten sich die Zellwände metachromatisch und aus ihnen traten die vielen blauen Kügelchen aus, die aneinanderstießen und die gewohnten Schollen bildeten. Diese blieben ungefähr 15 Minuten in dieser Form erhalten. Nach dieser Zeit erfolgte die Umbildung in Kristallnadeln.

Das *Sonnenblumenmark* ist auch hinsichtlich seines hohen Pektingehaltes (ungefähr 30%) sehr interessant (vgl. Müller und Overbeck 1941 und Kinzel 1953 b). Trotzdem verliefen die Erscheinungen in der gleichen Weise wie bei anderen Zellwänden.

Behandelt man die durch Methylenblau gefärbten Membranen von *Holunder*- oder *Sonnenblumenmark* mit verschiedenen konzentrierten KJ- bzw. KCNS-Lösungen, so kann man lediglich eine starke Metachromasie beobachten. Die Bildung irgendwelcher Kristallbüschel oder -nadeln konnte ich in keinem einzigen Falle beobachten.

b) Innenepidermen von *Allium cepa* wurden in Eau de Javelle getötet, um die in der Zelle vorhandenen Lipide zu zerstören (vgl. Hansteen-Cranner 1914). Dann wurden die Schnitte 3 Minuten lang in einer Methylenblaulösung 1 : 1000 angefärbt und hierauf mit einer 1 molaren  $\text{KNO}_3$ - bzw. 0,6 molaren KCNS- oder 0,6 molaren KJ-Lösung behandelt.

Die Behandlung mit  $\text{KNO}_3$  ließ keine Veränderungen gegenüber lebenden *Allium*-Epidermen erkennen. Ich konnte ein deutliches Tröpfchenstadium beobachten, und die im nächsten Stadium entstandenen Schollen hatten das gleiche Aussehen wie in lebenden Objekten.

Jedoch bewirkte das Durchsaugen der 0,6 molaren KCNS-Lösung lediglich eine Verfärbung nach rotlila, Kristallnadeln konnte ich nicht sehen.

Auch das Durchsaugen der 0,6 molaren KJ-Lösung hatte keine Kristallbildung zur Folge.

c) Innenepidermen von *Allium cepa* wurden durch längeres Liegen in  $\text{H}_2\text{O}_2$  getötet.  $\text{H}_2\text{O}_2$  zerstört bekanntlich Pektinstoffe (Kinzel 1953 b). Die Schnitte waren teilweise mazeriert und mußten bedeutend länger als die nicht mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelten Schnitte, nämlich 20 Minuten, in der Farblösung belassen werden, um eine gleich starke Speicherung zu erzielen. Dann aber waren die Ergebnisse auch analog zu den vorgenannten.

Wie beim vorigen Versuch hatte das Durchsaugen der  $\text{KNO}_3$ -Lösung die typische Schollenbildung zur Folge, während durch die KCNS- und KJ-Behandlung nur Metachromasie und keinerlei Kristallnadelbildung erzielt werden konnte.

d) Zellen der Innenepidermis von *Allium cepa* wurden nach verschiedener Vorbehandlung durch heißes Wasser getötet.

a) Die Zellen wurden zuerst mit Methylenblau 1 : 1000 ungefähr 3 Minuten lang angefärbt, sodann in 1 mol TRZ 10 Minuten lang plasmolysiert und hierauf in kochendes Wasser getaucht.

Zweck dieser Vorbehandlung ist das Loslösen des Protoplasten von der Zellwand und Tötung der Zellen.

Die Behandlung mit 1 mol  $\text{KNO}_3$  bewirkte die üblichen Stadien der Kugel-, Schollen- und Kristallnadelbildung. Alle Vorgänge wickelten sich hier in gleicher Reihenfolge ab wie am lebenden Objekt.

Saugte ich hingegen durch das Präparat verschieden konzentrierte KCNS-Lösungen durch, so war keine Kristallnadelbildung zu beobachten.

β) Die Zellen wurden zuerst in 1 mol TRZ 10 Minuten lang plasmolysiert, dann durch heißes Wasser getötet und hierauf mit einer Methylenblaulösung 1 : 1000 angefärbt.

Sodann wurden die Präparate mit den verschiedenen Salzlösungen behandelt.

Die Wirkungen waren die gleichen wie beim vorigen Versuch: die durch  $\text{KNO}_3$  bewirkte Schollenbildung fand statt, während durch KCNS keine Kristallnadelbildung erzielt werden konnte.

7) Ungefärbte Schnitte wurden in kochendem Wasser getötet und hierauf mit Methylenblau 1 : 1000 angefärbt.

Auch diese Versuchsanordnung hat die gleichen Ergebnisse wie die beiden vorigen:  $\text{KNO}_3$  bewirkte die übliche Schollenbildung, während durch KCNS keine Kristallnadeln entstanden.

8) Innenepidermen von *Allium cepa* wurden 15 Minuten lang in einer 1 molaren TRZ-Lösung plasmolysiert, dann durch Alkohol getötet und schließlich mit Methylenblau 3 Minuten lang angefärbt.

Das Durchsaugen einer 1 molaren  $\text{KNO}_3$ -Lösung bewirkte auch hier das Tröpfchenstadium, hierauf die Schollenbildung und schließlich die Umbildung der Schollen zu den stabilen Kristallspeifen.

Eine 0,6 molare KCNS-Lösung hatte hingegen nicht die Bildung der typischen Kristallnadeln zur Folge. Die blaugefärbten Zellwände veränderten nur ihren Farbton.

Aus allen diesen Versuchen geht eindeutig hervor, daß sich die früher geäußerte Vermutung als unrichtig erweist. Die Bildung von Schollen nach  $\text{KNO}_3$ -Zusatz ist nicht an die lebende Zelle gebunden, sondern geht auch bei Sonnenblumen- und Holundermark, bei Innenepidermen von *Allium cepa*, die durch verschiedene Mittel (Eau de Javelle,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , kochendes Wasser, Alkohol) getötet wurden, vor sich. Es bilden sich wie in der lebenden Zelle die typischen Schollen und die Netzmuster. Auch das durch KBr hervorgerufene Netzwerk ist vom Lebenszustand der Zelle unabhängig.

Ganz anders hingegen verhalten sich KCNS und KJ. Die durch diese Salze hervorgerufenen Kristallaggregate entstehen in keinem einzigen Fall in toten Zellen. Ihr Auftreten ist an die lebende Zelle gebunden, aber, wie die Plasmolyseversuche bewiesen haben, unabhängig vom an die Wand angelagerten Protoplasma.

#### 10. Versuche über die Ausfällung von Methylenblau durch verschiedene Salzkonzentrationen in vitro.

Um eine weitere Abgrenzung der an der lebenden Zelle beobachtbaren Erscheinungen von solchen Vorgängen, die auch in vitro zu beobachten sind, zu ermöglichen, stellte ich die in Tab. 1 wiedergegebenen Reihenversuche über die Ausfällbarkeit von Methylenblau durch verschiedene Salzlösungen an.

Ferner untersuchte ich die Stabilität der in vitro erzielbaren Schollen. Diese Schollenbildung in vitro wurde bereits von Borriß (1937) durch Zusammenfügen von konzentrierter Methylenblau- und  $\text{KNO}_3$ -Lösung beobachtet.

Auch diese Schollen beginnen sich nach 20–30 Minuten aufzulösen und in Kristallspeife umzubilden. Es ist also ein gleiches Verhalten wie bei den in Zellen entstandenen analogen Gebilden zu beobachten.

Tab. 1. Lösungszustand von Methylenblau 1:1000 in verschiedenen konzentrierten Salzlösungen. — = gelöst, + = ausgefallen.

Methylen- blau 1:100 cm <sup>3</sup>	Salzlösung 1 molar cm <sup>3</sup>	Dest. H <sub>2</sub> O cm <sup>3</sup>	Konzentr. der Salzlösung. mol	K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	KCNS	KJ	KBr	KNO <sub>3</sub>	KCl
1	9	—	0,9	+	+	+	+	+	+
1	8	1	0,8	+	+	+	+	+	+
1	7	2	0,7	+	+	+	+	+	+
1	6	3	0,6	+	+	+	+	+	+
1	5	4	0,5	+	+	+	+	+	—
1	4	5	0,4	+	+	+	+	—	—
1	3	6	0,3	+	+	+	+	—	—
1	2	7	0,2	+	+	+	+	—	—
1	1	8	0,1	+	+	+	+	—	—
1	0,9	8,1	0,09	+	+	+	+	—	—
1	0,8	8,2	0,08	+	+	+	+	—	—
1	0,7	8,3	0,07	+	+	+	+	—	—
1	0,6	8,4	0,06	+	+	+	+	—	—
1	0,5	8,5	0,05	+	+	+	+	—	—
1	0,4	8,6	0,04	+	+	+	+	—	—
1	0,3	8,7	0,03	+	+	+	+	—	—
1	0,2	8,8	0,02	+	+	+	+	—	—
1	0,1	8,9	0,01	+	+	+	+	—	—
1	0,09	8,91	0,009	+	+	—	—	—	—
1	0,08	8,92	0,008	+	+	—	—	—	—
1	0,07	8,93	0,007	+	+	—	—	—	—
1	0,06	8,94	0,006	+	—	—	—	—	—
1	0,05	8,95	0,005	+	—	—	—	—	—
1	0,04	8,96	0,004	+	—	—	—	—	—
1	0,03	8,97	0,003	+	—	—	—	—	—
1	0,02	8,98	0,002	+	—	—	—	—	—
1	0,01	8,99	0,001	+	—	—	—	—	—

## II. Versuche an anderen Objekten

Im ersten Teil dieser Arbeit hatte ich das Verhalten verschiedener Salze und verschiedener Farbstoffe geprüft, ferner die Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Zellen. Als Objekt hatte vorwiegend *Allium cepa* gedient.

Nun ging ich auch in bezug auf die Objekte in die Breite. Die folgenden Versuche geben das Verhalten von mit Methylenblau gefärbten Zellwänden gegenüber KNO<sub>3</sub>, KJ und KCNS wieder. Dabei konnte ich beobachten, daß

die beschriebenen Erscheinungen bei verschiedenen Objekten in verschieden hohen Salzkonzentrationen eintreten.

1. Versuch: Untere Blattepidermis von *Monstera deliciosa*. 2 Minuten Färbezeit in Methylenblau 1 : 1000.

Saugte ich durch das Präparat eine 0,6 molare KCNS-Lösung durch, so verfärbte sich die Membran nach Rotviolett, aber es traten keine wie immer gearteten Kristallnadeln auf. Erst bei einer Konzentration von 0,05 mol KCNS bildeten sich schöne lila Kristallnadeln, die teils einzeln, teils in Büscheln an der Innenseite der Zellwand ansetzten.

Die Innenepidermen von *Allium cepa* hingegen zeigten schon, wie früher erwähnt, bei einer Konzentration von 0,6 mol KCNS schöne Kristallnadeln. Es mußte also die KCNS-Konzentration, die bei *Monstera deliciosa* zur Ausbildung der Kristallnadeln nötig ist, gegenüber *Allium cepa* um mehr als das Zehnfache vermindert werden.

In ähnlicher Weise wie *Monstera deliciosa* verhielten sich die Epidermen fast aller untersuchten Objekte (vgl. Tab. 2).

2. Versuch: Untere Blattepidermis von *Tradescantia purpurii*. 2 Minuten Färbezeit in Methylenblau 1 : 1000.

Bei Behandlung des Objektes mit einer 0,5 molaren KJ-Lösung zeigten die Membranen lediglich eine starke Metachromasie. Erst bei 0,1 mol KJ bildeten sich die Kristallnadeln und -büscheln, die bei *Allium cepa* bereits bei höherer Konzentration (0,7 mol) auftraten.

Es war also auch bei KJ gegenüber *Allium cepa* eine Erniedrigung der Salzkonzentration notwendig.

3. Versuch: *Allium porrum*. 3 Minuten Färbezeit in Methylenblau 1 : 1000.

a) Zwiebelepidermis.

Saugte ich durch das Präparat, dessen Zellwände deutlich blau gefärbt waren, eine 1 molare KCNS-Lösung durch, so traten nur vereinzelt in ganz wenigen Zellen Kristallnadeln auf. Erst bei einer Konzentration von 0,6 mol traten an der Innenseite aller Zellwände dichte Büschel und Einzelkristalle von rotlila Färbung auf.

Bei KJ-Behandlung traten bei einer Konzentration von 0,4 mol an den Innenseiten der Membran die für KJ typischen Kristallbüschel auf.

b) Blattepidermis (Basis).

Die Zellwände der Blattepidermis zeigten beim Durchsaugen einer 0,6 molaren KCNS-Lösung nur eine starke Umfärbung der Zellwände. Kristallbildungen traten bei dieser Konzentration noch nicht auf. Bei der Blattepidermis war für die Entstehung der Kristallnadeln eine Konzentration von 0,1 mol nötig, also niedriger als bei der Zwiebelepidermis des gleichen Objektes.

Auch die KJ-Konzentration mußte bei der Blattepidermis gegenüber der Zwiebelepidermis vermindert werden, um die Kristallnadelbildung herbeizuführen. Bei einer Konzentration von 0,2 mol traten die Kristalle ganz allgemein an der Innenseite aller Membranen auf.

Blattmitte und Blattspitze zeigten gegenüber der Blattbasis keine Veränderungen. In allen Teilen des Blattes war für die Entstehung der Kristallbildungen die gleiche Salzkonzentration notwendig: 0,2 mol KJ und 0,1 mol KCNS.

*Allium porrum* zeigt also den Übergang zwischen dem Typus von *Allium cepa* und dem Typus der übrigen Objekte:

In der Zwiebelepidermis von *Allium porrum* sind für die Ausbildung der Kristallaggregate die gleichen Salzkonzentrationen erforderlich wie bei der Zwiebelepidermis von *Allium cepa* (0,6 mol KCNS, 0,5 mol KJ).

Die Blattepidermis hingegen zeigte bereits den Typus der übrigen Objekte: 0,1 mol KCNS, 0,2 mol KJ (vgl. Tab. 2).

\*

Zur Deutung dieser Ergebnisse ließe sich etwa vermuten, daß die Zellwände verschiedener Zelltypen verschiedene Mengen von sauren Substanzen (Pektinstoffe!) enthalten. Dadurch würden verschiedene Farbstoffmengen

Tab. 2. Optimale Salzkonzentration (in mol) zur Ausbildung der typischen Kristallformen.

Objekt	KCNS	KJ	KNO <sub>3</sub> <sup>1)</sup>
<i>Allium cepa</i> , Innenepidermis . . . . .	0,6 mol	0,5	1
<i>Allium sativum</i> , Innenepidermis . . . . .	0,6	0,5	1
<i>Allium porrum</i> , Zwiebelepidermis . . . . .	0,6	0,4	1
<i>Allium porrum</i> , Blattepidermis . . . . .	0,1	0,2	1
<i>Iris germanica</i> . . . . .	0,1	0,1	1
<i>Panicum miliaceum</i> . . . . .	0,1	0,1	1
<i>Tradescantia purpurii</i> . . . . .	0,1	0,1	1
<i>Aucuba japonica</i> . . . . .	0,1	0,1	1
<i>Bougainvillea glabra</i> . . . . .	0,09	0,1	1
<i>Barbacenia squamata</i> . . . . .	0,08	0,05	1
<i>Agapanthus umbellatus</i> . . . . .	0,06	0,2	1
<i>Dracaena</i> sp. . . . .	0,05	0,1	1
<i>Euphorbia splendens</i> . . . . .	0,05	0,1	1
<i>Cassia floribunda</i> . . . . .	0,05	0,1	1
<i>Monstera deliciosa</i> . . . . .	0,05	0,1	1
<i>Helleborus niger</i> . . . . .	0,05	0,1	1
<i>Dieffenbachia imperialis</i> . . . . .	0,05	0,1	1
<i>Piper longum</i> . . . . .	0,05	0,1	1
<i>Chlorophytum Sternbergianum</i> . . . . .	0,05	0,1	1
<i>Nerium oleander</i> . . . . .	0,04	0,1	1

<sup>1)</sup> Bei KNO<sub>3</sub> kann man nicht von einer optimalen Konzentration im eigentlichen Sinn sprechen. Die Reaktion kommt in einem weiteren Konzentrationsbereich zustande — so auch bei 0,1 mol, wo die Schollen allerdings kleiner sind. Bei KJ und KCNS hingegen besteht eine deutliche Konzentrationsschwelle.

gebunden werden, die mit dem zutretenden Salz bei höherer Konzentration eine submikroskopische Fällung in der Membran geben, während bei niedrigeren Konzentrationen die Kristallisation langsamer und unter Bildung mikroskopisch sichtbarer Kristallaggregate verlaufen könnte. Dann müßte

man allerdings die zusätzliche Annahme machen, daß im Falle der Nitrate der Mechanismus der Ausscheidung ein etwas anderer, gegen Konzentrationsänderungen weniger empfindlicher ist. Auf eine solche Andersartigkeit weist auch schon die Tatsache hin, daß bei den Nitraten als Vorläufer der Kristallbildung ein Tröpfchen- und Schollenstadium auftritt, das bei den Jodiden und Rhodaniden fehlt.

Ganz allgemein wäre noch zu bemerken, daß eine befriedigende Deutung solcher und ähnlicher Beobachtungen nur dann möglich wäre, wenn die Verhältnisse in konzentrierten Farbstoff- und Salzlösungen durch physikalisch-chemische Untersuchungen geklärt würden, eine Aufgabe, die natürlich nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit lag.

### Zusammenfassung

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit den kristallinen und kristallähnlichen Bildungen, die bei der Behandlung von Zellen, deren Zellwände basische Farbstoffe gespeichert haben, mit Lösungen bestimmter Salze entstehen. Es wurden außer den von Borris (1937) und Pekarek (1938) verwendeten Reagenzien noch eine größere Zahl anderer Salze sowie auch einige andere Farbstoffe untersucht.

Chloride, Sulfate und Salze organischer Säuren sind nicht imstande, die Bildung distinkter gefärbter Gebilde auszulösen. Es kommt lediglich zu der schon von Borris beschriebenen „Negativfärbung“.

Im übrigen sind die Anionen für das Aussehen der Musterbildungen entscheidend, die Kationen bewirken nur die Verdrängung des Farbstoffes aus der Membran.

Sowohl Nitrate als auch Bromide rufen nach Färbung mit Methylblau innerhalb der Zellen bestimmt geformte Gebilde hervor. Während die durch Bromide erzeugten Aggregate in ihrer ursprünglichen Form erhalten bleiben, erfahren die durch Nitrate entstandenen Bildungen eine Modifikationsänderung: die instabilen „Schollen“ gehen nach einer bestimmten Zeit in die stabile Kristallform über.

Jodid und Rhodanid bewirken kristallinische Bildungen. Während die Jodidaggregate stabil sind, bilden sich die durch Rhodanid hervorgerufenen Kristalle nach einer gewissen Zeit in anders geformte um.

Auch Färbung mit Toluidinblau und nachfolgende Salzbehandlung bewirkt in der Zelle die Entstehung bestimmter Aggregate, Neutralrot hingegen vermag mit Salzen innerhalb der Zellen keine stabilen Gebilde zu liefern.

Während Nitrate und Bromide auch in abgetöteten und von vornherein toten Zellen nach Methylblaufärbung bestimmt geformte Aggregate bilden, vermögen KCNS und KJ nur in lebenden Zellen ihre typischen Kristallformen zu bilden. Die Frage, welche Qualitäten der Zellwand beim Tod der Zelle so verändert werden, daß die geschilderten Erscheinungen zustande kommen, muß vorderhand noch unbeantwortet bleiben.

Zur Bildung der Rhodanid- und Jodidkristalle ist eine optimale Salzkonzentration erforderlich, die von der Art der verwendeten Zellen abhängig ist. Zellen der Zwiebelinnenepidermen von *Allium cepa* und *Allium porrum* brauchen eine höhere Konzentration als die übrigen Objekte (zumeist Epidermen verschiedener Blätter). Bei  $\text{KNO}_3$  läßt sich ein unterschiedliches Verhalten verschiedener Zelltypen nicht feststellen.

#### Literatur

- Arens, K., 1937: Manganablagerungen bei Wasserpflanzen als Folge des physiologisch polarisierten Massenaustausches. *Protoplasma* 30, 104.
- Bank, O., und K. Esterák, 1935: Granulabildende Zellsubstanzen treten durch das lebende Plasmalemma. *Protoplasma* 24, 404.
- Borriss, H., 1937: Beiträge zur Kenntnis der Wirkung von Elektrolyten auf die Färbung pflanzlicher Zellmembranen mit Thioninfarbstoffen. *Protoplasma* 28, 23.
- Brauner, L., 1933: Zur Frage der postmortalen Farbstoffaufnahme von Pflanzenzellwänden. *Flora* 127, 190.
- Bungenberg de Jong, 1932: Die Koazervation und ihre Bedeutung für die Biologie. *Protoplasma* 15, 110.
- Czaja, A., Th., 1934: Untersuchungen über metachromatische Färbungen von Pflanzengewebe. II. Basische Farbstoffe. *Planta* 21, 531.
- 1937: Untersuchungen über den Membraneffekt des Absorptionsgewebes und über die Farbstoffaufnahme in die lebende Zelle. *Planta* 26, 90.
- Drawert, H., 1937: Das Verhalten der einzelnen Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe gegen saure und basische Farbstoffe bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration. *Flora* 132, 91.
- Gicklhorn, J., 1927: Über die Entstehung und die Formen lokalisierter Manganspeicherungen bei Wasserpflanzen. *Protoplasma* 1, 372.
- 1929: Kristalline Farbstoffspeicherung in Protoplasma und Zellsaft pflanzlicher Zellen nach vitaler Färbung. *Protoplasma* 7, 341.
- Hansteen-Cranner, B., 1914: Über das Verhalten der Kulturpflanzen zu den Bodensalzen. III. Beiträge zur Biochemie und Physiologie der Zellwand lebender Zellen. *Pringsh. Jahrb.* 53, 536.
- Hirn, I., 1953: Vitalfärbungsstudien an Desmidiaceen. *Flora* 140, 453.
- Höfler, K., 1926: Über Eisengehalt und lokale Eisenspeicherung in der Zellwand der Desmidiaceen. *Sber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl., Abt. I*, 135, 103.
- 1946: Über den I.E.P. natürlicher Zellulosemembranen und deren Färbbarkeit mit Fluorochromen. *Anz. Öst. Akad. Wiss. vom 6. April, Jg. 1946, Nr. 7*.
- 1952: Über die Farbionenpermeabilität der Tonoplastenmembran. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 65, 183.
- 1953: Zur Vital- und Fluoreszenzfärbung. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 66, 453.
- und H. Schindler, 1953: Vitalfärbbarkeit verschiedener Closterien. *Protoplasma* 42, 296.
- und A. Stiegler, 1947: Cresylechtviolett als Vitalfarbstoff. *Mikroskopie* 2, 250.
- Kersting, F., 1935: Über Adsorption von Farbstoffen an Zellwänden und ihre Verdrängung durch anorganische Salze. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 55, 329.
- Kinzel, H., 1953 a: Untersuchungen über die Chemie und Physikochemie der Gallertbildungen von Süßwasseralgen. *Öst. bot. Z.* 100, 25.
- 1953 b: Die Bedeutung der Pektin- und Zellulosekomponente für die Lage des Entladungspunktes pflanzlicher Zellwände. *Protoplasma* 42, 209.

- Kinzel, H., 1955: Zur Kausalfrage der Zellwand-Fluorochromierung mit Akridinorange. *Protoplasma* 45, 73.
- Kohlshütter, V., und C. Egg, 1925: Über somatoide Bildungsformen. *Helvetica chimica acta*, 8, Fasc. VI, 457.
- Kressin, G., 1935: Beiträge zur vergleichenden Protoplasmatik der Mooszelle. Diss. Greifswald.
- Küster, E., 1937: Über Vakuolenkontraktion und Membranfärbung bei *Helodea* nach Behandlung mit Vitalfärbemitteln. *Z. Mikrosk.* 54, 435.
- 1951: Über einige an gefärbten Pflanzenzellen auftretende Entfärbungserscheinungen. *Z. Mikrosk.* 60, 257.
- Lehmann, O., 1888: Molekularphysik, I. Bd.
- Lepke, E., 1951: Über Kuppenfärbung und Vererzungs- und Verseifungsbilder bei *Helodea*. *Z. Mikrosk.* 60, 36.
- Molisch, H., 1909: Über lokale Membranfärbungen durch Manganverbindungen bei einigen Wasserpflanzen. *Sber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl. Abt. I*, 118, 1427.
- Müller, H. F., und W. Overbeck, 1941: Zur Kenntnis der Einjahrespflanzen. *Ber. dtsh. chem. Ges.* 75, 909.
- Pekarek, J., 1938: Über die Wirkung von Nitraten auf die Färbung pflanzlicher Zellmembranen und Zellsäfte mit Azur I. *Protoplasma* 30, 161.
- Pfeffer, W., 1886: Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. *Unters. Bot. Inst. Tübingen* 2, 179.
- Rosenbusch-Wülfing, 1921—1924: *Mikroskopische Physiographie*, 1. Bd., 1. Hälfte.
- Schönleber, K., 1937: Beiträge zur Kenntnis der Manganvererzungen der Pflanzenzellmembranen. *Protoplasma* 27, 599.
- Vogelsang, H., 1875: *Die Krystalliten*. Hrsg. v. F. Zirkel, Bonn.
- Wagner, H., 1929: Kristallisationserscheinungen bei Farbsalzen. *Kolloid-Z.* 48, 248.

# Physiology of the Motive Force of Protoplasmic Streaming<sup>1</sup>

By

Noburô Kamiya, Hiromichi Nakajima and Shigemi Abe

Department of Biology, Faculty of Science, Osaka University

With 10 Text-Figures

(Received May 16, 1956)

In the physiological studies dealing with protoplasmic streaming the rate of flow has hitherto been used almost exclusively as the measure of its activity. Changes in the rate of flow under various conditions, however, do not always represent proportional changes in the motive force behind the streaming, since the rate is dependent not only on the motive force but also on the viscosity of protoplasm resisting the flow. Thus in order to understand the cause of the change in the rate of flow under a certain experimental condition, it is necessary to decide to what extent the change in the rate is due to the change in the motive force responsible for the flow, and to what extent it is due to the change in viscosity. This was a classical problem left unsolved for a long time, as we had no method for determining the motive force of the flow directly. And yet before this problem is solved, further analysis in the physiological studies on protoplasmic streaming is hardly possible. Thus the physiology of the protoplasmic flow stuck to a deadlock at this point.

There is, however, a particular case in which we are at present in a position to do away with this deadlock, since for the slime mould there is a method developed by Kamiya (1940, 1942, 1953), which enables us to measure directly the motive force of the protoplasmic flow.

The present report deals with the effect of various chemical agents consisting mainly of metabolic inhibitors on the motive force and the results are considered in relation to the metabolism behind the protoplasmic flow.

The experiments were performed in the following manner: namely, the motive force was first measured under normal condition without reagent in the milieu, then with a certain reagent and finally after the reagent was removed.

<sup>1</sup> Supported by a Grant for Fundamental Scientific Research from the Ministry of Education.

The material used in the present experiment was the plasmodium of *Physarum polycephalum*, which was originally developed from sclerotia supplied by the late Professor Seifriz and was cultured at 20° C. in the laboratory on oatmeal by the method of Camp (1936).

### Measurement of the Motive Force—"Dynamoplasmometry"

A diagram of the general arrangement for measuring the motive force is illustrated in Fig. 1. At the left of the figure is a glass chamber divided by a septum into two compartments, *A* and *B*. Two protoplasmic masses, *a* and *b* (about 10 mg. each), are connected by a fine protoplasmic strand

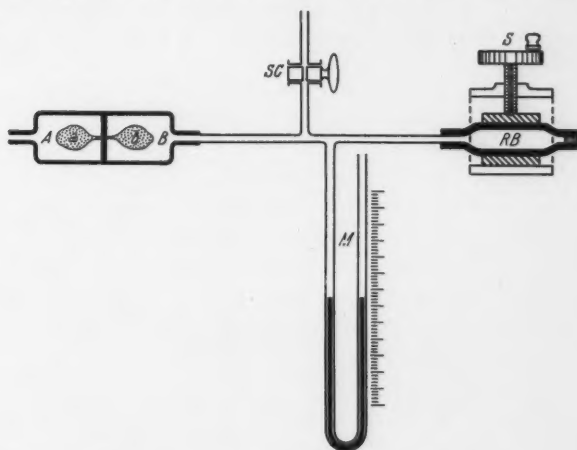


Fig. 1. Diagram showing the general arrangement for measuring the motive force of the protoplasmic streaming. The whole system consists of a double-chamber having compartments *A* and *B*, manometer *M*, stop-cock *SC* and rubber bulb *RB* the volume of which is controlled by screw *S*. Protoplasmic mass in *A* and *B* is designated *a* and *b* respectively.

penetrating the central septum of the chamber. It is not difficult to make such a preparation, since the strand and two blobs of protoplasm readily fuse with each other to make a so-to-speak dumbbell-shaped plasmodium. The connecting strand is a fine capillary of protoplasm having a wall of plasmagel, along which the endoplasm flows back and forth. A possible gap between the connecting strand and the groove in the central glass septum is filled with a small amount of vaseline, so that an airtight seal is made between the two compartments.

When the pressures in the compartments *A* and *B* are equal, the protoplasmic streaming along the strand goes on in the same manner as it does under natural state changing its direction alternately. The streaming in one direction either from *a* to *b* or from *b* to *a* lasts around one minute

before it takes the opposite direction again. Since the endoplasmic motion along the connecting strand is influenced extremely sensitively by the difference between the air pressure in *A* and that in *B*, the protoplasm can easily be made to reverse the direction of the streaming as well as to flow faster or slower than the normal speed. Thus we can easily find from manometer *M* just how much difference in pressure is necessary between *A* and *B* in order to keep the protoplasm in the connecting strand at a standstill. As the counter-pressure which just stops the flow is the compensation pressure of the motive force responsible for the protoplasmic flow, the former must be equal to the latter. Kamiya referred to such pressure as „balance-pressure“ and the above method as „double-chamber method“. In practice, compartment *A* is open to the atmosphere while the pressure in compartment *B* is under control by means of screw *S* and a rubber bulb *RB*. The simple setup shown schematically in Fig. 1 enables us to make the pressure in *B* sufficiently higher or lower than that in *A*.

One of the merits of the double-chamber method is that the balance-pressure is determined independently of the viscosity of the protoplasm and of the diameter of the connecting strand. What is dependent of the viscosity or the bore of the connecting capillary is the sensitivity of the induced flow reacting to the change in the pressure difference<sup>2</sup>.

For keeping the endoplasm in the connecting strand immobile, it is necessary to control the pressure in *B* without interruption, as the motive force developed in the living protoplasm keeps changing spontaneously. In order to determine in what manner and to what extent the motive force changes in relation to time, instantaneous values of the balance-pressure were read at short intervals, such as every 10 or 15 seconds. By plotting these successive values as ordinates against time as abscissas, undulating curves are obtained which faithfully portray the distinguishing features of the change which the motive force undergoes in accordance with the autonomic scheme of the protoplasm. We also resorted to a self-recording manometer by means of which the balance-pressure curve was registered automatically.

Such a curve showing the force developed in protoplasm against time is highly significant as a criterion representing the dynamic activity of protoplasm and also in the study of rhythmicity in living organism. This was what Kamiya called by the name of „dynamoplasmogram,“ which is abbreviated as DPG.

<sup>2</sup> By utilizing this characteristic, the double-chamber method is useful also for estimating protoplasmic viscosity. „A dumbbell-shaped plasmodium consisting of its own capillary and two ‘reservoirs’ of protoplasm is, as it were, in itself a capillary viscometer. If one releases a balance-pressure of known value and compares the velocities of protoplasmic flow at the time of release in a treated and a control plasmodium, one can estimate the relative viscosity of the interior flowing protoplasm under controlled conditions. As the inner diameter of the connecting strand is not kept exactly the same, some correction for this is needed“ (Kamiya 1942).

In general, the wave form and amplitude of the DPG change spontaneously even when the external conditions are kept constant. We are often encountered with beat-like waves in which the amplitude changes periodically, or with waves in which peculiar forms are repeated, or with waves in which characteristic forms change transitionally wave after wave (Kamaya 1953), all of which represents the rhythmic activities of the organism under normal state. The variability of the dynamoplasmogram patterns was explained by Kamaya as a result of interference among the physiological rhythmus having different frequencies that coexist in one and the same plasmodium.

Generally, the undulating curves of DPG are not cut equally by the base-line into upper and lower halves but are biased either above or below the base-line. That is, the areas surrounded by the undulating curve and the base-line are different on the plus and minus sides. This means that the motive force is exerted more intensively in one direction than in the other. Because of this polar nature of the motive force, a plasmodium, were it free to move, would advance by flowing forward a little more each time, and by not retreating all the way back to its original position when the flow reverses. The mean height of the wave is therefore the indication of the dynamic polarity of the organism, in other words, it is a measure of the taxis of the plasmodium.

#### Method of Admitting Chemical Agents

By using the double-chamber, we can study directly the effect of various chemical agents on the motive force responsible for the protoplasmic streaming. There are two procedures of treating the protoplasm in the double-chamber. Namely, in the first place, the same condition is given to both compartments, so that the two blobs of protoplasm are treated evenly, and in the second place, only one compartment, *A*, is brought under special condition while the other compartment, *B*, is left under the normal state. The DPG obtained in the latter case showed the difference in the inner pressure between the treated and untreated (control) side of one and the same plasmodium. These two methods of treatment are mutually complementary for the analysis of the phenomenon.

The measurement of the motive force can be done even if the double-chamber is filled with water in place of air. When admitting chemical agents to the protoplasm, therefore, the experiments were conducted by filling the chamber either with air or water, whichever convenient for the purpose. Various types of double-chambers were made for treating the plasmodium, of which the one shown in Fig. 2 is an example. The positions of the three-way stop-cocks  $C_1$ ,  $C_2$  and  $C_3$  shown in the figure are those assumed when the measurement is made. The vent *q* is open to the atmosphere and vent *s* is connected to the manometer and the pressure controller.  $d_1$  and  $d_2$  placed in the capillaries leading to vents *q* and *s* are

kerosin drops which are used when the protoplasm is treated with gas or vapour. When the pressure in *B* is modified in the experiment, the oil drop,  $d_2$ , naturally shifts along the capillary to some extent. This is, however, by no means a hindrance in measuring the motive force, as  $d_1$  and  $d_2$  work as, so to speak, frictionless pistons. And yet the existence of these oil drops prevents the gas or vapour from diffusing out of the chamber. When the two compartments are to be brought under experimental con-

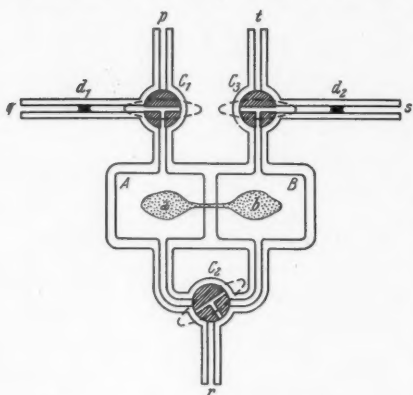


Fig. 2. Double-chamber for measuring the motive force of the protoplasmic streaming while admitting chemical agents. For explanations see text.

ditions, gas is let in from the vent *p* to compartment *A*, and then to *B* via  $C_2$ , and let out from vent *t*, stopcocks  $C_1$ ,  $C_2$  and  $C_3$  being in the positions  $\vdash$ ,  $\perp$  and  $\dashv$  respectively. After the air is thoroughly replaced with the experimental gas or vapour, measurement of the motive force is carried on by bringing the direction of the cocks to the initial positions shown in Fig. 2. In case when only one half of the organism is to be treated, gas is let into compartment *A* through vent *p* and let out from it,  $C_2$  being in  $\dashv$  position, through vent *r*. In this case, the gas can be trapped in *A* if we bring back the cocks to the positions shown in Fig. 2.

When solutions are to be admitted in place of gas, oil drops are no more needed. The two compartments, *A* and *B*, are filled with solution up to the capillaries to the proximity of the place, where oil drops were put. In the following experiments, we used  $2 \times 10^{-2}$  M phosphate buffer (pH 7.0) as the basic solution. The pattern of the DPG does not change when the gas or buffer solution in the double-chamber is replaced with the same kind of gas or buffer solution. Therefore, the process of substitution of the medium *per se* has no effect on the generation of the motive force.

## Results

### 1. Low oxygen tension

The relation of oxygen tension to the protoplasmic streaming in the plasmodium of *Physarum polycephalum* has been studied by Kitching and Pirene (1940), Allen and Price (1950), Loewy (1950), Ohta (1952), Kamiya (1953), etc. Kitching and Pirene reported that streaming ceases under complete lack of oxygen but only a small partial pressure (1–3 mm. Hg column) of oxygen is sufficient for maintaining or restarting the streaming. According to Allen and Price (1950), the streaming is normal until the oxygen pressure reaches 2.4% of the atmo-

spheric pressure; the rate of flow diminishes slightly under 1% oxygen; under 0.3% oxygen, streaming still continues while growth can no longer occur. Even under complete lack of oxygen, streaming lasts for several hours. On the other hand, Loewy (1950) observed that the plasmodium of *Physarum polycephalum* disintegrates in pure nitrogen in 20–80 minutes, but a small quantity of  $\text{CO}_2$  removes the toxic effect. Namely, in the mixed gas of 95%  $\text{N}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$ , streaming continues in spite of complete lack of oxygen, for more than 24 hours without showing any ill effect. Loewy is thus of the opinion that the cessation of flow under pure nitrogen is not due to the fact that oxygen is indispensable for supplying energy consumed by the streaming, but to the lack of carbon dioxide. Interesting though these reports are, it is not clear whether or not the cause of the cessation of flow is due to the elimination of the motive force or to the increase in viscosity.

Using the double-chamber method, Ohta (1952b) and Kamiya (1953) mapped dynamoplasmograms of *Physarum polycephalum* under lack of oxygen. As nitrogen gas is not perfused but kept enclosed in the two compartments during the experiment, a small amount of  $\text{CO}_2$  produced by the organism as a result of fermentation (Ohta 1954) may be contained in the two compartments. A possible toxic effect due to the complete absence of  $\text{CO}_2$  may thus be excluded. Ohta (1952b) observed that the magnitude of the motive force did not change or that it slightly increased under anaerobiosis. The results obtained by Kamiya showed a striking increase in the motive force in nitrogen gas.

Fig. 3 shows the results when the plasmodium was treated in its entirety with nitrogen gas. Cylinder nitrogen containing about 0.1% oxygen was used for this experiment. The normal pattern of dynamoplasmogram in the air is shown in the first 12 minutes. At the vertical line I dynamoplasmometry was interrupted and the plasmodium was brought under anaerobic condition. From Fig. 3 we see that the amplitude and the period of the wave under anaerobic condition increased to about 150% of those under the normal state in the air. At the vertical line II fresh air was substituted again for nitrogen in the two compartments. In Fig. 3 we notice that the motive force diminished after nitrogen gas was replaced with the air, and the period, too, became smaller than the period shown before the organism was treated with nitrogen. The waves, however, gradually resumed their original, normal pattern after air was supplied. The phenomenon is thus completely reversible.

The fact obtained by us that the motive force does increase, instead of decrease, under low oxygen tension is a further support of the result of Kamiya's experiment (1953), but it is utterly contradictory to the implicit assumption hitherto held. Fig. 4 shows the case in which only one side of the plasmodium was subjected to the anaerobic state while the other half was in the air. During the first 12 minutes both compartments A and B were filled with air. At the time designated by a vertical line I the air in compartment A was replaced with nitrogen. After this treatment we see

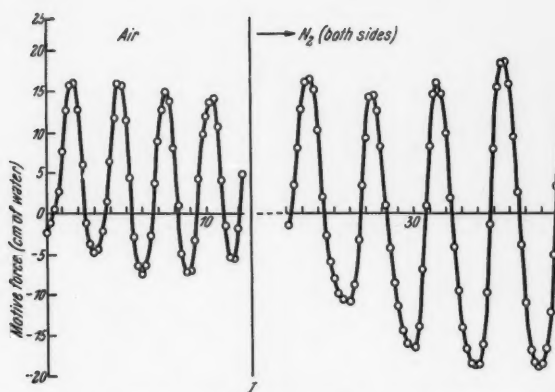


Fig. 3. Generation of the motive force under anaerobic conditions. During the period lying between the two vertical lines, both compartments, A and B, were anaerobic.

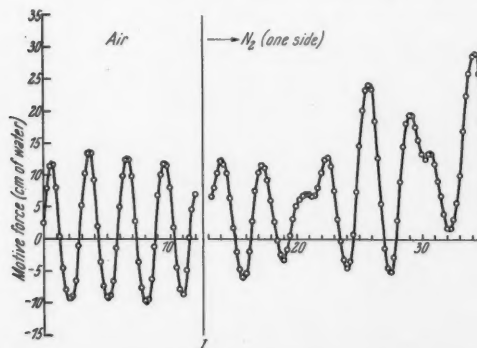
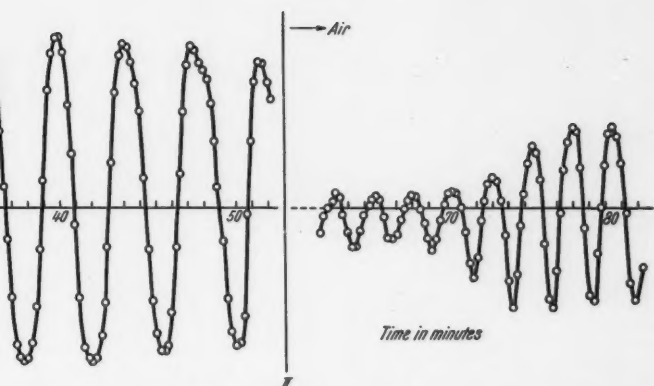
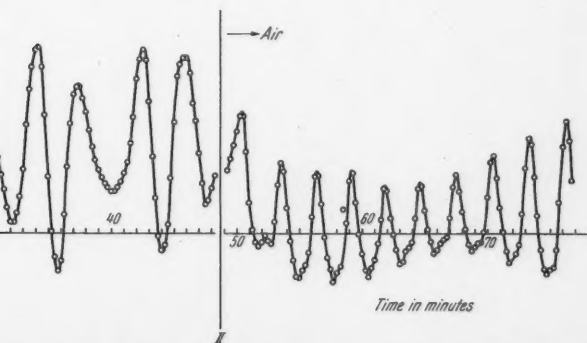


Fig. 4. Generation of the motive force when only compartment A was anaerobic. During the period lying between the two vertical lines, compartment A was anaerobic while compartment B was aerobic.



anaerobic state. During the period lying between the two vertical lines, *A* and *B*, were filled with nitrogen (Temp. 20° C.).



only one half of the plasmodium was under anaerobic state. Vertical lines, *I* and *II*, compartment *A* was filled with nitrogen was left filled with air (Temp. 17° C.).



that not only the wave form was modified but also the undulating curve was shifted upward wave after wave. In other words, the polarity of the organism changed conspicuously by the one-sided treatment. The upward trend of the undulating curve indicated an increasing strength of taxis from the nitrogen side to the air side, since we needed more positive counter pressure to the air side in order to keep the protoplasm from flowing into the compartment filled with air. Such an effect is, however, no longer to be observed in a mixed gas of 95%  $N_2$  + 5%  $O_2$  (Ohta 1952 b).

It is shown in Fig. 4 that the wave form underwent considerable variation when only one half of the plasmodium was under  $N_2$  gas. They were brought about as a result of interference of wave groups generated on the  $N_2$  side and air side. We can well understand these wave patterns as a combination of two series of waves of a period ratio of 2 : 3 and later of 1 : 2. As a matter of fact, the foregoing experiment (Fig. 3) showed that both period and amplitude of the DPG in nitrogen, increased to about 150% of the control. Generally, the dynamoplasmogram of a plasmodium, only half of which is treated with a certain agent, represents the result of the interference of the rhythmic motive force generated under normal condition and that produced under a special experimental condition.

When nitrogen gas in compartment A was replaced with air at the second vertical line II, the waves descended quickly as a whole showing that the dynamic polarity was restored to the original state. The restoration of the dynamic polarity is, however, to be observed sooner or later even when  $N_2$  gas in compartment A is not replaced with air. Thus the plasmodium is said to have the ability to adjust its dynamic polarity autonomously (Kamaya 1953).

To sum up, the foregoing experiment demonstrated beyond doubt that low oxygen tension increased rather than decreased the motive force behind the protoplasmic streaming.

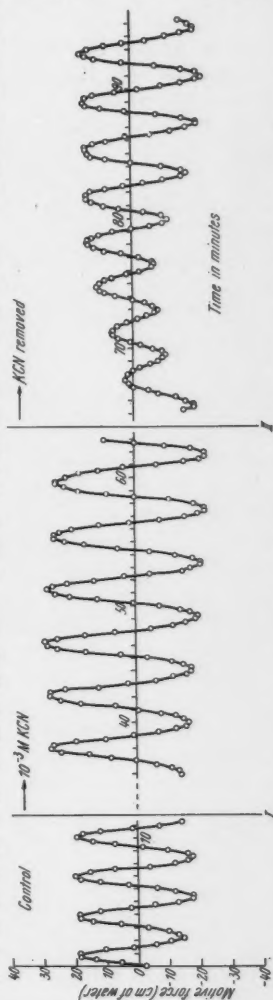


Fig. 5. Generation of the motive force under the effect of  $10^{-3}$  M KCN. Both sides of the plasmodium, a and b, were treated evenly during the period between I and II (Temp. 21°C).

## 2. KCN

According to Allen and Price (1950), the oxygen uptake of *Physarum polycephalum* was inhibited to 77%, 47%, 28% and 22% of the control by  $10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  and  $5 \times 10^{-3}$  M KCN respectively. The data of experiments performed by Ohta showed similar but somewhat less appreciable inhibition. On the other hand, Seifriz and Urbach (1944) reported that  $10^{-3}$  M KCN had no observable effect on the protoplasmic streaming of the same plasmodium, while the expansion of the surface area completely ceased at the same concentration. Fig. 5 shows a case in which  $10^{-3}$  M KCN (pH 7.0) was admitted to both compartments. We see that the motive force had the tendency to increase its amplitude under the effect of KCN just as under low oxygen tension. When the buffer solution containing KCN is replaced with the plain buffer solution, the motive force which had increased under KCN, decreased to an extent smaller than the control before it gradually regained its normal magnitude. Here again the process is perfectly reversible.

## 3. 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP)

2,4-dinitrophenol suppresses conspicuously the production of the motive force, at the concentration at which the oxygen uptake is reported to increase to 120–140% of the control. Fig. 6 represents the result of an experiment in which  $5 \times 10^{-4}$  M 2,4-DNP (pH 7.0) was admitted to both compartments. The wave during the first 30 minutes represent the normal feature of the motive force generation in a buffer solution. During the period between the two vertical lines, I (at 36.5 min.) and II (at 78.5 min.), the material was under the effect of  $5 \times 10^{-4}$  M 2,4-DNP. As shown in Fig. 6, during the first 10 minutes or so after DNP was admitted the motive force was still produced to an extent even greater than the control, but the dynamic activity was eventually worn off. Hand in hand with the decrease of the motive force, decrease in the viscosity of protoplasm was also ascertained. Estimation of viscosity was done, as mentioned before, by examining the rate of the protoplasmic flow induced artificially in the connecting strand between the two compartments. Even after the reagent was removed at the vertical line II the production of the motive force was left almost null for about 10 minutes, before it gradually recovered to become normal an hour later as indicated by the figure. Therefore, in this case too, the process was perfectly reversible.

To the above fact we must add the result of further experiments conducted under anaerobic state. In this experiment DPG obtained under nitrogen gas without DNP was taken as the control. It was shown that, even in the anaerobic state, the motive force was decreased under the influence of 2,4-DNP of the same concentration as used in the foregoing experiment. This is a fact to be noted in as much as 2,4-DNP is known as an uncoupler of the oxidative phosphorylation. We shall discuss this problem later.

## 4. Monoiodoacetic acid (MIA)

Monoiodoacetic acid, which inhibits dehydrogenation from triose-phosphate, affects the motive force of the protoplasmic flow remarkably.

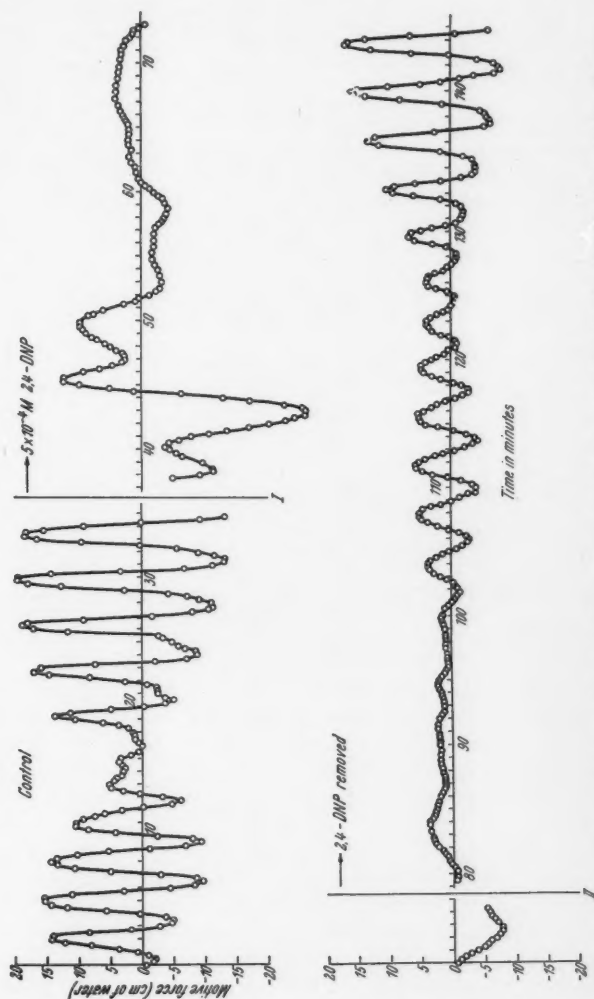


Fig. 6. Dynamoplasmogram under the effect of  $5 \times 10^{-4}$  M 2, 4-dinitrophenol. Both sides of the plasmodium, a and b, were treated evenly during the period between I and II (Temp.  $20^{\circ}$  C.).

Fig. 7 shows the effect of  $2 \times 10^{-3}$  M MIA (pH 7.0) on the motive force generation. Contrary to 2,4-DNP, viscosity of the protoplasm was increased to such an extent in this case, that the passive intracapillary flow of protoplasm could not occur even when pressure difference larger than the normal

motive force, e.g. 30 cm. of water column, was established between the two compartments. When such a condition was reached, measurement of the motive force was no longer permitted. In the case of the example presented in Fig. 7 the viscosity of protoplasm got so high before 30 minutes have elapsed in the presence of  $2 \times 10^{-3}$  M MIA, that further measurement was impossible. Even at the concentration of  $1 \times 10^{-3}$  M, at which concentration the respiration is scarcely affected, the motive force is clearly inhibited.

### 5. NaF

Fluorides are known as a fermentation poison which inhibits dehydration of 2-phosphoglyceric acid at the hands of enolase. In the plasmodium, the respiration is not much affected by this reagent of  $5 \times 10^{-3}$  M

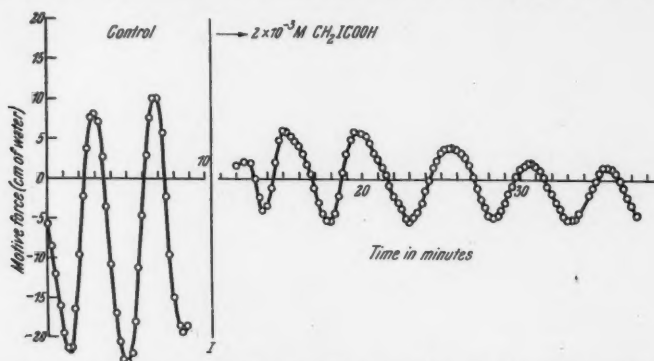


Fig. 7. Dynamoplasmogram under the effect of  $2 \times 10^{-3}$  M monoiodoacetic acid. Both sides of the plasmodium, a and b, were treated evenly at the time marked with the vertical line I (Temp. 17°C.).

(Ohta 1954). The dynamoplasmogram pattern, on the other hand, underwent remarkable changes at the same concentration as shown in Fig. 8. The motive force diminished to  $\frac{1}{4}$  the normal value, while in contrast to MIA, the viscosity decreased gradually in this case. After elimination of NaF, the motive force generation did not recover immediately.

### 6. Ether

Concerning the effect of anaesthetics on the plasmodium, there are reports by Seifriz (1941, 1950). Among anaesthetic agents, ether and chloroform were investigated so far in detail by means of the double-chamber technique. When the slime mould is treated with 1% ether solution, both periodic activity and the magnitude of the motive force disappear almost completely, but they recover their normal activity after ether solution is replaced with water (Kamiya 1953). Ohta (1952a) reported that chloroform augments the motive force in a low concentration but suppresses it in high concentration. Periodicity also disappears reversibly in high concentration.



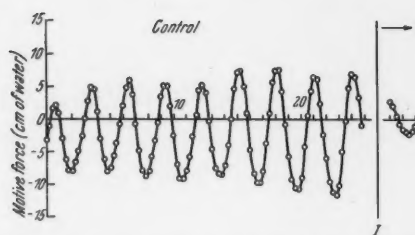


Fig. 8. The effect of  $5 \times 10^{-8}$  M NaF on the motile force of *a* and *b*, were treated evenly.

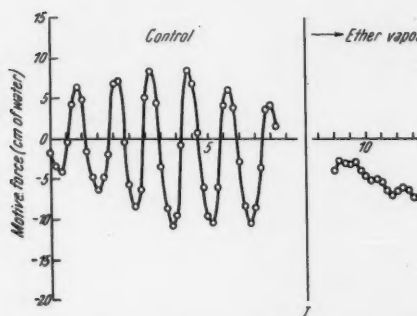
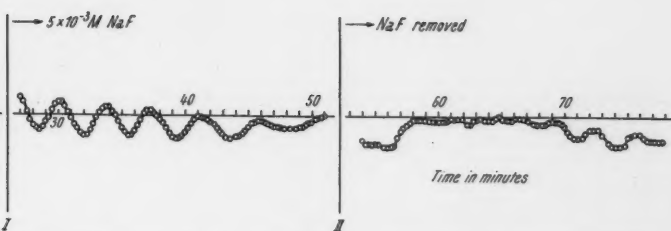
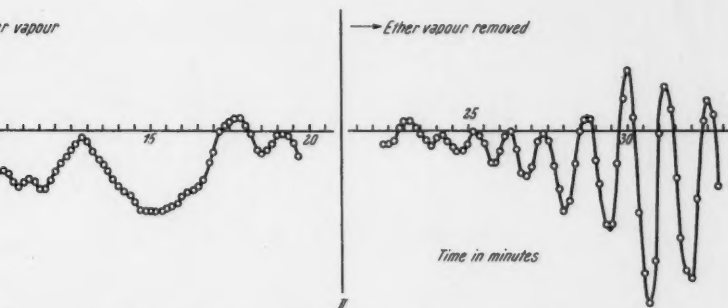


Fig. 9. Dynamoplasmogram under the effect of  $5 \times 10^{-8}$  M NaF on the motile force of *a* and *b*, were treated evenly.



on the production of the motive force. Both sides of the plasmodium, evenly during the period between I and II (Temp. 25° C.).



the effect of ether vapour of 50% saturation. Both sides of the plasmodium, evenly during the period between I and II (Temp. 25° C.).

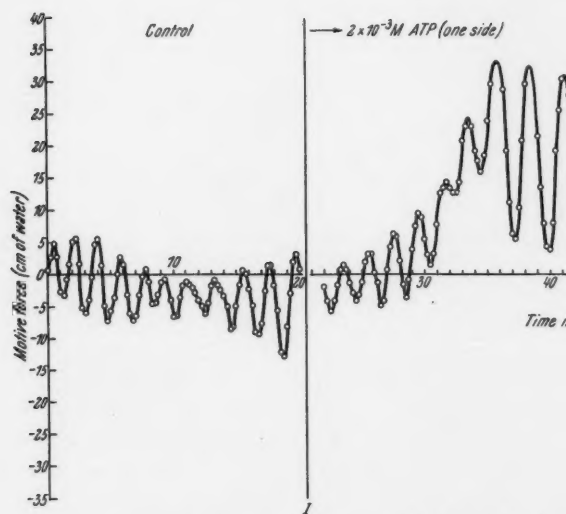
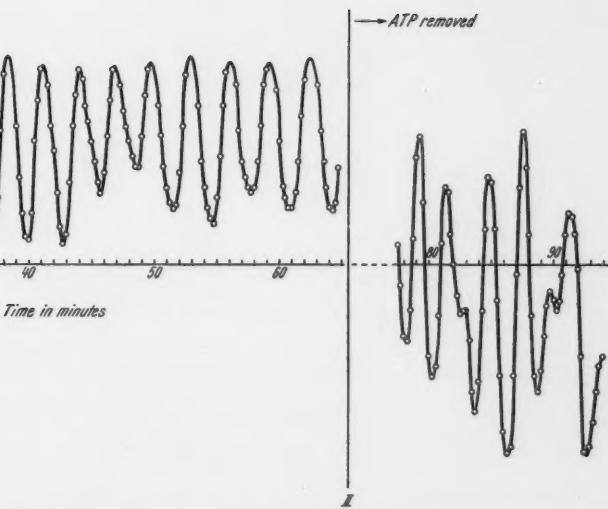


Fig. 10. Dynamoplasmogram under the effect of  $2 \times 10^{-3} \text{ M ATP}$  (one side) (Fig. 2) at I. ATP was removed at t



$\times 10^{-3}$  M ATP admitted to one half of the plasmodium (a in at the time designated as II (Temp. 23° C.).



In Fig. 9 is presented a case in which the plasmodium is treated with  $\frac{1}{2}$  saturated ether vapour (saturated vapour was diluted with moist air at the ratio of 1:1). It is to be recognized that, though regular periodicity disappeared under the effect of ether vapour, the motive force still remained to a considerable extent in the presence of this vapour. Once fresh air was substituted for the vapour at the second vertical line, the regular periodicity came into evidence and the amplitude of the waves gradually increased. Thus the process is shown to be reversible.

### 7. Adenosine triphosphate (ATP)

In view of the assumption that the energy-rich phosphate bond of ATP is the direct energy source of the protoplasmic streaming just as it is for muscle contraction and other energy-requiring physiological processes, it is important to know the effect of ATP on the generation of the motive force. In Fig. 10 is shown an example in which only one half of a plasmodium was treated with  $2 \times 10^{-3}$  M ATP. The two compartments *A* and *B* were both filled with phosphate buffer (pH 7.0) at first; at the vertical line *I* marked at 20 minutes on the time scale,  $2 \times 10^{-3}$  M ATP dissolved in the same buffer solution was substituted for the solution in compartment *A*. The change in the wave pattern after ATP was admitted is very characteristic. Though there appeared no immediate change in amplitude, period and polarity of the wave, the wave train began to show a pronounced tendency to take an upward course 6 to 7 minutes after ATP was admitted to the protoplasmic blob in the left compartment (*A*). This indicates the tendency of the plasmodium to stream from the ATP side to the side of plain buffer solution. 15 minutes after ATP was admitted to the left half of the plasmodium, i.e., further than 35 minutes on the time scale, the motive force repeats its periodic activity without taking further upward course with an amplitude that is conspicuously augmented. By replacing the ATP solution in compartment *A* with the plain buffer solution, the waves as a whole took a downward course again, but their amplitude did not show a tendency to decrease even 25 minutes after ATP was removed.

As for the viscosity of protoplasm, it was noticed in this experiment that no immediate change followed after ATP was admitted. Only several minutes later, i.e., accompanying the increase in the motive force, viscosity also increased. The increase in viscosity persisted also after ATP was removed.

In respect to adenylic acid (AMP) of both the muscle and yeast, we could not observe any effect whatsoever comparable to that produced by ATP. There are furthermore no discernible changes in viscosity of protoplasm under the influence of muscle and yeast AMP. Thus we may assume that the characteristic behaviour of the plasmodium and especially the augmentation of the motive force brought about by ATP are caused by the energy-rich phosphate bond of ATP.

### Discussion

The pronounced augmentation of the motive force of the protoplasmic flow in the plasmodium when ATP is supplied from without is in conformity with the view that the direct energy source of the protoplasmic flow is ATP. As a matter of fact, the recent experiment performed by Takeuchi and Hatano (1955) of our laboratory showed the existence of ATP in the plasmodium of *Physarum polycephalum* at the concentration of  $0.5-1.0 \times 10^{-3}$  M. It was also impressively demonstrated by them that ATP obtained from the slime mould contracts the glycerinated muscle (psoas) of a rabbit as conspicuously as muscle ATP does.

An observation in confirmation of the view that ATP is the direct energy source of the protoplasmic motion was also made in *Amoeba* by Goldacre and Lorch (1950) who noticed that the flow of endoplasm in *Amoeba discoides* occurred in distal direction from the locus where 1-3% ATP was injected with a micropipette. The result we obtained in respect to the effect of ATP on the myxomycete plasmodium further demonstrated this fact on a quantitative basis.

What is important next is the problem of a system which responds to ATP. How the chemical energy is converted into the energy of the motive force is certainly the key point in the mechanism of protoplasmic streaming. It was Loewy who first studied the ATP-sensitive protein system of the plasmodium. Using 1.2 M KCl (pH 8.2) he extracted from the plasmodia a fraction, the viscosity of which underwent a very rapid decrease with the addition of ATP. This decrease was, however, followed by an increase in viscosity which reached a level much higher than that before ATP was added. It was ascertained that this increase in viscosity was brought about by adenosine monophosphate (AMP) produced as a result of dephosphorylation of ATP. At any rate, the characteristic change in viscosity of the crude KCl extract which Loewy studied is believed to correspond to the remarkable reaction of actomyosin-sol with ATP. Recently T'so *et al.* reported similar but somewhat different results about the ATP-sensitive protein fraction.

With the intention of studying the actomyosin-like proteins of the myxomycete plasmodium in detail, one of us (Nakajima 1955, 1956) extracted a fraction from the plasmodium with Weber-Edsall solution (0.6 M KCl, 0.01 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.04 M  $\text{NaHCO}_3$ ) and purified it by dilution method. He found that the purified sample of this protein fraction is surprisingly similar to the actomyosin-sol obtained from muscles in respect to the response to ATP. Namely, the viscosity of the fraction decreases conspicuously with the addition of ATP which, however, gradually returns to the nearly original viscosity level as dephosphorylation of ATP occurs: the process is repeated in a reversible fashion. Unlike the results obtained by Loewy or by T'so *et al.* AMP has no effect on the viscosity of the protein fraction purified by Nakajima. The effects of  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{Mg}^{++}$  are also basically the same both on this fraction obtained from the slime mould

and on the actomyosin-sol obtained from muscles in respect to their responses to ATP.

In a word, the experiments conducted by Loewy (1952), Nakajima (1955, 1956) and Ts'o *et al.* (1956) all indicate that a protein system similar to actomyosin in muscles also exists in the myxomycete plasmodium. Especially the data obtained by Nakajima show a striking identity of the two. Just as in case of muscles we are inclined to assume by analogy that it is this protein system which converts the chemical energy of ATP into mechanical energy. It may be that a change in the molecular configuration or in the state of molecular aggregation of this protein system induced by ATP plays an essential part in the mechanochemical coupling involved in the protoplasmic flow.

Coming back now to the results of the present experiments, it was shown that the motive force rather increased than decreased when the plasmodium was brought under low oxygen tension or when it was treated with KCN. The effect of carbon monoxide is also known to be practically the same (Ohta 1952 b). Fermentation poisons, e.g., sodium fluoride or monoiodoacetic acid, on the other hand, markedly depressed the motive force of the protoplasmic streaming. The results suggest at least in the case of the plasmodium, that the energy available for the generation of the motive force is supplied by fermentation while energy acquired by respiration is hardly useful for the streaming.

It was shown in the foregoing that 2,4-dinitrophenol, a well-known uncoupler of oxidative phosphorylation, markedly inhibited the generation of the motive force. This fact might make one believe that oxidative phosphorylation is essential to the protoplasmic flow. But it is not likely to be the case in the light of our experiment that 2,4-DNP of the same concentration inhibited the production of the motive force under the absence of oxygen as well. Thus it follows that the suppression of the motive force under 2,4-DNP is not necessarily due to the uncoupling of oxidative phosphorylation. This conclusion is well in conformity with the results of the experiment performed by Takeuchi and Hatano (unpublished) who showed that the level of ATP lowered conspicuously under the influence of 2,4-DNP no matter whether the organism was in aerobic or anaerobic state. Though the problem as to what process is attacked in a reversible fashion by 2,4-DNP in this case still awaits further study, the data so far obtained by us indicate that the energy required for the streaming in the slime mould is supplied by fermentation. We are conducting supplementary experiments in this connection using a specially designed double-chamber, which enables us to measure simultaneously both the motive force and the oxygen consumption of the plasmodium under various experimental conditions. The results of these experiments, which will be published elsewhere, confirm the conclusion still more clearly that fermentation is essential to the protoplasmic flow in the slime mould. Viewed from this standpoint the increase in the motive force under anaerobic state or under the influence of KCN or CO can be neatly understood as reflect-

ing the increase in fermentation under these conditions. As a matter of fact, Pasteur effect has been observed in this material by Ohta (1954).

As mentioned before, the direct energy source of the motive force production is thought to be the energy-rich phosphate bond in the form of ATP. Why is it then that ATP produced by respiration with high efficiency is not available for the mechanical work in producing the motive force while ATP synthesized by fermentation with low efficiency is available for it? It is important to know to what physical or chemical conditions this difference in ATP availability is due. For this difference we think the topological difference in the production of energy-rich phosphate bond in the cytoplasm between respiration and fermentation is responsible. A possible explanation for this is that ATP synthesized in mitochondria does not diffuse out readily into the mechanochemical system of the hyaloplasm in this organism while ATP produced by fermentation occurring in the "soluble part" of the cytoplasm, i. e., hyaloplasm, where the mechanochemical system exists, is readily available.

Still insufficient though our knowledge is, we are now in a position to figure out the general process of the production of the motive force in the myxomycete plasmodium as follows: namely,

1. actomyosin-like contractile proteins are present in the myxomycete plasmodium;
2. changes in the molecular configuration or aggregation pattern of these proteins are responsible for the generation of the motive force of the protoplasmic flow;
3. the energy required for it is supplied by ATP;
4. the ATP in question is produced in the process of fermentation.

These conclusions naturally involve not a few speculations and obscurities. This is especially true of the second item, as we know practically nothing about the dynamic organisation of the actomyosin-like contractile proteins in a protoplasmic system like a plasmodium. Our knowledge is also still too meager to explain how the motive force responsible for the protoplasmic flow is generated according to a periodic pattern which is so clearly demonstrated in the DPG. Yet by assuming the above view as a working hypothesis at present, it is possible to arrange the data so far obtained by other workers and by ourselves with least contradictions.

### Summary

1. The motive force responsible for the protoplasmic streaming in the myxomycete plasmodium, *Physarum polycephalum*, was measured by means of the double-chamber method under the influence of various chemical agents.
2. The motive force rather increases than decreases under anaerobic state as well as under the effect of KCN. The process is reversible.
3. Monoiodoacetic acid and sodium fluoride, both fermentation poisons, decrease the strength of the force back of the protoplasmic streaming.

4. 2,4-dinitrophenol inhibits the motive force production both under aerobic and anaerobic conditions.

5. ATP admitted from without markedly increases the motive force of the protoplasmic streaming. The effect is manifested several minutes after the reagent is applied and continues several ten minutes after the reagent is removed.

6. As the fermentation poisons depresses the generation of the motive force while conditions inhibiting respiration do not depress it, it was concluded that the direct energy source of the protoplasmic streaming is ATP synthesized by fermentation process.

#### References

- Allen, P. J., and W. H. Price 1950: The relation between respiration and protoplasmic flow in the slime mould, *Physarum polycephalum*. Amer. J. Bot. 37, 393—402.
- Camp, W. G., 1936: A method of cultivating myxomycete plasmodia. Bull. Torrey Bot. Club 63, 205—210.
- Goldacre, R. J., and I. J. Lorch, 1950: Folding and unfolding of protein molecules in relation to cytoplasmic streaming, amoeboid movement and osmotic work. Nature 166, 497—500.
- Kamiya, N., 1940: Control of protoplasmic streaming. Science 92, 462—463.
- 1942: Physical aspects of protoplasmic streaming. The Structure of Protoplasm (ed. by Seifriz). Monogr. Amer. Soc. Plant Physiol. (Ames-Iowa), 199—244.
- 1953: The motive force responsible for protoplasmic streaming in the myxomycete plasmodium. Ann. Rep. Sci. Works, Osaka Univ. 1, 53—85.
- Kitching, J. A., and M. H. Pirenne, 1940: The influence of low tensions of oxygen on the protoplasmatic streaming of myxomycetes. J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.) 16, 131—135.
- Loewy, A. G., 1950: Protoplasmic streaming under anaerobic conditions in a myxomycete. J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.) 35, 151—155.
- 1952: An actomyosin-like substance from the plasmodium of a myxomycete. J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.) 40, 127—156.
- Nakajima H., 1955: A contractile protein in the slime mould. XX. Ann. Meeting Bot. Soc. Japan.
- 1956: Some properties of a contractile protein in the slime mould. Seitai no Kagaku (Medical Science) 7, 49—52 (in Japanese).
- Ohta, J., 1952 a: Experimental studies on the protoplasmic streaming in the myxomycete plasmodium, I. Some observations on the motive force of protoplasmic streaming. Cytologia 17, 210—218.
- 1952 b: Experimental studies on the protoplasmic streaming in the myxomycete plasmodium, II. The effects of some respiratory poisons and reduced oxygen tension on the motive force of the protoplasmic streaming. Cytologia 17, 300—310.
- 1954: Studies on the metabolism of the myxomycete plasmodium. J. Biochem. 41, 489—497.
- Seifriz, W., 1941: A theory of anesthesia based on protoplasmic behavior. Anesthesiology 2, 300—309.

- Seifriz, W., 1950: The effects of various anesthetic agents on protoplasm. *Anesthesiology* 11, 24—32.
- and F. Urbach, 1944: Physical activities and respiration in slime molds. *Growth* 8, 221—233.
- Takeuchi, I., and S. Hatano, 1955: Energy-rich phosphate compounds in the slime mould and their levels in relation to some external conditions. XX. Ann. Meeting Bot. Soc. Japan.
- Ts'o, P. O. P., J. Bonner, L. Eggman, and J. Vinograd, 1956: Observations on an ATP-sensitive protein system from the plasmodia of myxomycete. *J. gen. Physiol. (Am.)* 39, 325—347.

## **Origins and Formation of Intracellular Inclusions Associated with Two Leguminous Virus Diseases**

By

**Yukio Koshimizu and Norio Iizuka**

Morioka Experiment Station of Tohoku National Agricultural Experiment Station.  
Higashianiwa, Morioka, Japan

With 32 Figures

*(Received May 16, 1956)*

Although the intracellular inclusions that are a characteristic feature of virus infections in both plants and animals have been shown to contain a considerable amount of virus, there is as yet little adequate explanation for them. This character is not necessarily significant unless it is known whether this "bound virus" is still attached to the centres at which it was synthesized, or is merely virus that has been in circulation in the cell and has become attached secondarily.

It might be thought that no definite explanation could be given for the presence of virus in inclusion bodies until we have more knowledge of the sites of virus synthesis and of other reactive processes of the cell to virus infections. On the contrary, however, there is some possibility that we might be able to find out about the sites of virus synthesis, if we knew the origins and modes of formation of inclusion bodies. Indeed, this is one of the main reasons for the study of intracellular inclusions.

Bald (1948) has brought forward some evidence that the amoeboid inclusion bodies of tobacco mosaic virus might develop from the plastids. He also expressed the opinion that if confirmation was found for the hypothesis that inclusion bodies developed from plastids, the presence of virus in them might suggest virus synthesis in plastids. One of the authors (1955), studying the development of inclusion bodies caused by several plant viruses, has briefly reported results similar to Bald's, and on the basis of cytochemical tests further suggested that the activities of enzymatic systems in plastids might be directed to virus synthesis.

Recent electron microscopic studies on virus-infected cells (Hidaka 1955; Stahmann und Kaesberg 1955) have shown that virus-like filaments appeared to be localized in chloroplasts.

Last year, the authors found inclusion bodies of three different types which are well suited to such an investigation. They are produced by two viruses that have been isolated from white clover grown at Morioka.

In the present paper an attempt has been made to offer further evidence by means of vital observation and cytochemical tests that intracellular inclusion bodies develop from plastids or nucleoli.

The authors are indebted to Dr. Z. Hidaka of Hatano Tobacco Experiment Station for permission to mention certain as yet unpublished results. Thanks are also due to Dr. S. Yatsuyanagi and Dr. Y. Tagami of Morioka Experiment Station for many kinds of aid.

### Materials and Methods

*Viruses.*—The two viruses are found almost invariably as a complex in white clover. Separation of the two viruses from the complex is possible because broad bean (*Vicia Faba*) is susceptible to only one of them, and the aphid *Myzus persicae* Sulz. transmits only the other.

The experimental results on symptoms, physical properties, host ranges, and transmissibilities, show that neither of them is identical to any virus described previously. But it was hardly possible to identify them without direct reference to known viruses, infecting leguminous plants which have been but little studied in Japan. Here we will content ourselves with stating that one constituent of the complex has some properties like pea streak virus (Holmes 1950), and the other may be a strain of *Phaseolus* virus 2. The details will be given elsewhere. In this paper, for convenience we shall call the first virus 1, and the second virus 2.

*Material plants.*—Lower leaf epidermis and stem epidermis of white clover and pea (Variety Kinuzayaendo) were used, because these tissues contained many well developed inclusion bodies. Most of the vital observations on the development of inclusion bodies caused by the virus 2 were made with the stem epidermis of pea only.

Young seedlings of these plants were sap-inoculated with each virus, and at a suitable interval after inoculation leaves or stems were cut from them. These pieces were infiltrated in tap water. Soon after infiltration leaf epidermis or stem epidermis to which was attached the chlorenchymatous cells immediately below it were stripped off with a razor.

The strips were mounted in 5 per cent sucrose. By peeling with a sharp razor so that only a few cells were killed, cells could be kept in an active state of cyclosis for several hours. For plasmolysis 0.5 or 0.7 M solutions of  $\text{CaCl}_2$  were used.

The methods of staining and cytochemical tests were those described by Bald (1949), Glick (1949), and Lison (1953).

For observation of the intranuclear inclusions a Tiyoda phase contrast microscope was used.

Although it would be the best for such a study to trace development of inclusion bodies in one cell, as Sheffield (1931) has done with leaf hairs

of solanaceous plants, it was impossible in our study to follow her method since the pea lacked hair cells. Fortunately, our materials possessed some advantages, in that inclusion bodies occurred in almost all epidermal cells with great regularity. Further, in a long strip of stem epidermis different stages of development could be seen, all of which proved to develop later to the same completed inclusion bodies.

## Results

### Inclusion bodies caused by virus 1

This virus has a wide host range and causes in all susceptible plants inclusion bodies of a new type as shown in Fig. 1 and 12. The inclusions stick together to corners of the cell and model exactly after the shapes of the corners.

Although there has been no information concerning such inclusion bodies, as far as we know, it would be not unreasonable to regard them as virus inclusion bodies, because they are always found abundantly in leaf epidermis of infected plants, and they have staining and cytochemical properties similar to those of virus inclusion bodies of common types.

*Epidermal cells of the healthy plants.* The leaf epidermal cells contain several pale green chloroplasts, and the stem epidermal cells also contain a number of such chloroplasts.

It must be emphasized that these plastids do contain green pigment, although the colour is so light that it is easily overlooked.

They are therefore intermediate-plastids and not leucoplasts. Weber *et al.* (1954) also found such small, pale green chloroplasts in leaf epidermis.

*The development of the inclusion bodies.* Symptoms appear first as vein clearing, about 4 or 5 days after inoculation under favourable growth conditions.

At about the same time an early stage of formation of the inclusion bodies can be seen: Some plastids are attached to corners of cells, and often at two or three corners of the same cell, homogeneous and achromatic bodies about the same size as plastids can be seen as shown in Fig. 10. The very small bodies are the initial inclusion bodies. It is only when they are stained that they can be distinguished from normal plastids.

They increase in size gradually along the cell wall, maintaining the same structure, and finally develop to large inclusion bodies as shown in Fig. 12. Even such large inclusions appear homogeneous and translucent. In the course of development it is frequently observed that one or two plastids are being enclosed in an inclusion body (Fig. 11). The developed inclusion bodies maintain their structure unchanged, and have not been seen to alter in appearance. Cells in which inclusion bodies have fully developed contain few or no plastids.

These phenomena are very conspicuous, but it is impossible to deduce any relationship between plastids and the inclusion bodies from such observations on the intact cells only. However, once the cells are plasmolysed,

the situation becomes more favourable. All normal plastids and inclusion bodies, both small and well developed, appear to contain more or less of the pale green pigment (Fig. 3). The colour can be seen more easily in strongly plasmolysed cells, and appears to be diffused throughout the inclusion bodies (Fig. 4). During plasmolysis and deplasmolysis the bodies change their shape and size, tending to become more nearly spherical on plasmolysis (Fig. 3), and returning to their original shape and position on deplasmolysis. These observations suggest that the inclusion bodies have a bounding membrane which is less permeable than protoplasm membrane, and that they are fixed to the protoplasm membrane at the corners of the cells.

Furthermore, a similar modification of the plastids can be seen much more clearly in the chlorenchymatous cells immediately below the stem epidermis. As shown in Fig. 6 and 7, most of the chloroplasts in the cells have stuck to the cell walls and subsequently fuse into inclusion bodies similar to those of the epidermis. Even after fusion these bodies still contain dense green pigment.

These observations suggest that the inclusion bodies caused by the virus, which we should like to call "corner inclusion bodies," develop principally from plastids.

It is impossible, however, to tell whether they are made up exclusively of plastids or whether they consist of plastids and cytoplasm. The movement of the plastids and their attachment to the protoplasm membrane may suggest that both take part together in the establishment of the initial inclusion bodies.

#### Inclusion bodies (X-bodies) caused by the virus 2

For a few days after inoculation no macro- or micro-scopic difference is observed in the host plants. Vein-clearing, a first stage in the development

Fig. 1. "Corner inclusion bodies" in alive epidermal cells.  $\times 760$ .

The cells in the figures are of white clover.

Fig. 2. Healthy cells plasmolysed slightly. The empty parts are like the shapes of the inclusion bodies in Fig. 1.  $\times 760$ .

Fig. 3. Slightly plasmolysed cells containing inclusion bodies with the pale green pigment.  $\times 900$ .

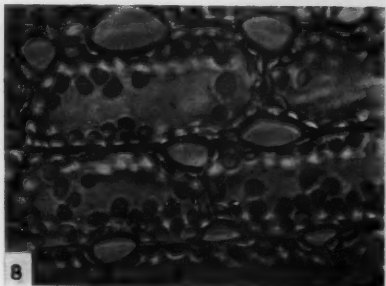
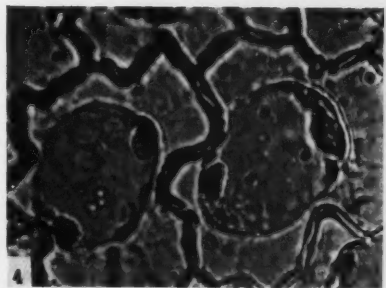
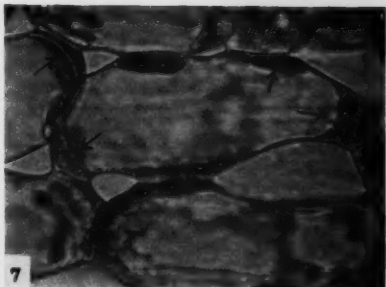
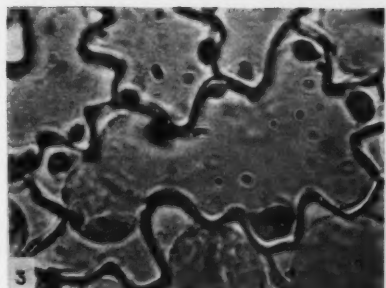
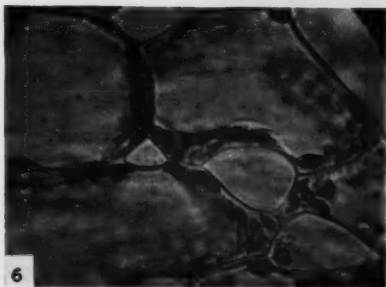
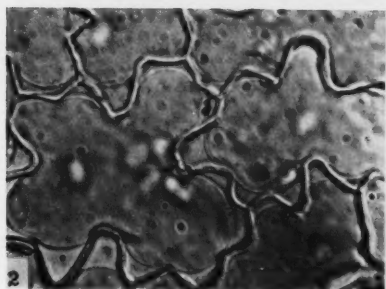
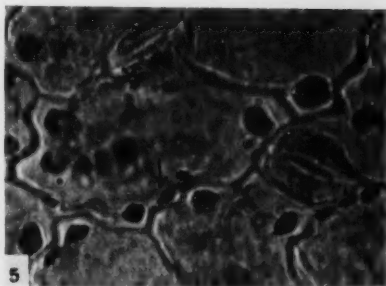
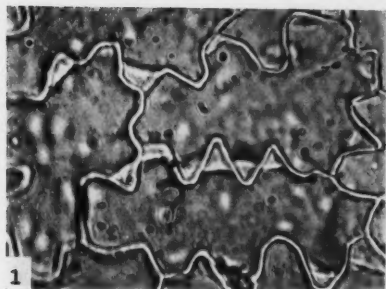
Fig. 4. More strongly plasmolysed cells containing developed inclusion bodies.  $\times 900$ .

Fig. 5. Inclusion bodies stained with Azure A. Even small bodies indistinguishable from normal plastids are stained densely as well as large bodies.  $\times 900$ .

Fig. 6. Chlorenchymatous cells of pea. Most chloroplasts are adhered to the cell walls.  $\times 1050$ .

Fig. 7. The adhered chloroplasts are fused together and stuck to corners of the cells.  $\times 1050$ .

Fig. 8. Chloroplasts of healthy chlorenchymatous cells.  $\times 1050$ .



of chlorosis, appears in about 7 days. At about the same time definite symptoms can be seen within the epidermal cells.

At first we shall describe inclusions found in the stem epidermis, where they are abundant, well developed, and easy to study.

The first effect of the virus observed microscopically is an aggregation of several small pale green plastids, which appear to be loosely bound together. As shown in Fig. 17 and 18, these masses are located near the nuclei, but they are carried about the cell by protoplasmic streaming. At first sight they appear to be composed of plastids only, but sometimes they can be seen to be bound together by fine, hyaline, protoplasmic strands which appear to be partly separated from the streaming protoplasm.

When we come to examine tissue from plants which have been inoculated for 10 to 15 days, we see that, by successive aggregation and fusion, these masses of plastids are now beginning to form the initial inclusion bodies which are coloured with the green pigment. The initial inclusion bodies appear to consist exclusively of plastids, some remaining apparently intact, whilst the others are more or less modified in one of two different ways.

They can either be granulated or swollen, in each case without loss of green pigment. Swollen plastids may later become vacuolated. Complex types, showing both changes at the same time, are common. The green pigment appears to be granular in the granular bodies, and is apparently distributed in the swollen and vacuolated bodies.

The outer part of the granular inclusions consists apparently of many loosely bound plastids. Only towards the inner part do the plastids become granular, and may lose the green pigment. In this type we have never found any indication of a limiting membrane.

Inclusion bodies of the homogeneous type appear to be thoroughly diffused with the green pigment. In addition, on plasmolysis they decrease in size, and on deplasmolysis recover the initial size, though decrease in size is far less than that of protoplasm membrane. This suggests the pre-

---

Fig. 9. Epidermal cells of healthy white clover.  $\times 900$ .

Fig. 10. An early stage of formation of the inclusion bodies. Most plastids are moved near the cell walls.  $\times 820$ .

Fig. 11. Plastids being enclosed in the inclusion bodies are seen.  $\times 820$ .

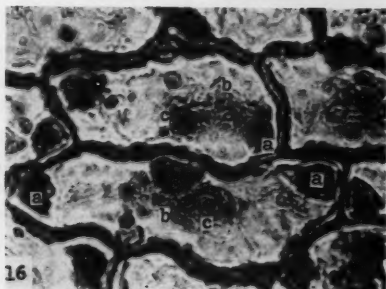
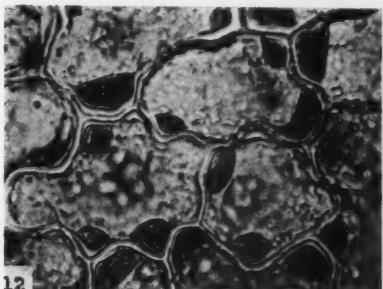
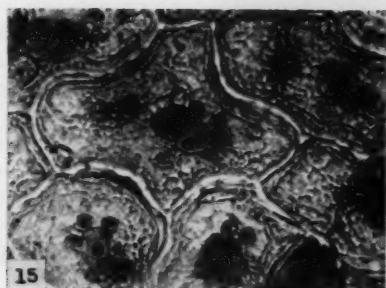
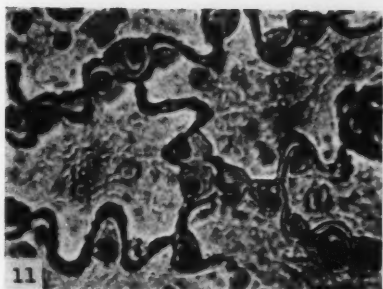
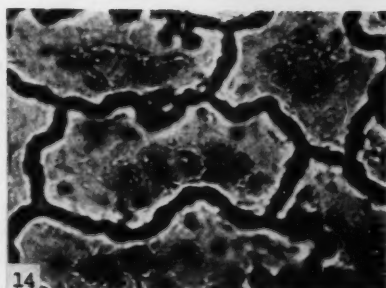
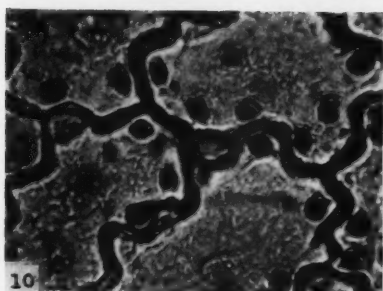
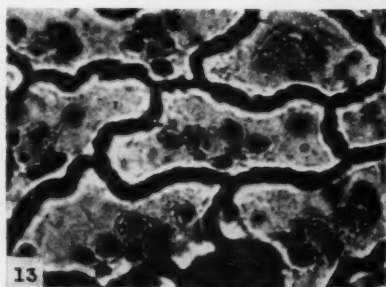
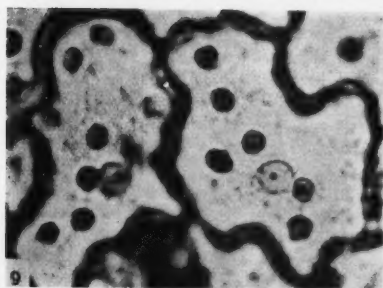
Fig. 12. Fully developed inclusion bodies stained brown with IKI solution. No plastid is seen.  $\times 820$ .

Fig. 13. An early stage of formation of the inclusion bodies caused by the virus 2. Plastids burst into minute granules are seen.  $\times 790$ .

Fig. 14. Most plastids are burst and form dense masses of the minute granules.  $\times 790$ .

Fig. 15. These masses become more compact, forming X-bodies.  $\times 790$ .

Fig. 16. Simultaneous occurrence of inclusion bodies of the three types: (a) "corner inclusion bodies," (b) amorphous inclusion bodies (X-bodies), (c) intranuclear inclusions.  $\times 790$ .



sence of a limiting membrane, presumably a modified plastid membrane.

The inclusion bodies remain coloured for up to two or three weeks. During this time they contain to grow by successive aggregation and subsequent fusion of further plastids. By about one month after inoculation, most inclusion bodies of both types have developed to the completed form and appear as shapeless masses of minute granules which probably originate from disintegrated or burst plastids. They are now colourless, and the two types can no longer be distinguished. Throughout our experiments no crystallization of the inclusion bodies has been seen.

Next, we shall describe inclusion bodies in the chlorenchymatous cells. In this tissue they occur in only a small percentage of the cells, but if one cell is found to contain an inclusion body, all the cells in its vicinity are also found to contain them. As in the case of virus 1, we can most clearly see the process of formation, because the typical chloroplasts contain dense green pigment. The earliest visible sign is aggregation of the chloroplasts as described for the stem epidermis. Aggregation is very obvious: over half the chloroplasts in a cell may aggregate near the nucleus (Fig. 20). This phenomenon may be called "Plastidsystrophy."

The history of the later development of these aggregates is almost the same as that described for the epidermis: they develop gradually into shapeless and granular bodies with the pigment. As shown in Figs. 21 and 22, the bodies are made up almost only of chloroplasts, and, in these cells, only a few normal chloroplasts can usually be seen, although in some cases a cell may contain both an inclusion and many intact chloroplasts (Fig. 24). Fig. 23 shows a chloroplast developing to a colourless body, presumably an initial inclusion body. Fig. 24 shows two bodies containing many fragments of the green pigment.

Besides the above mentioned inclusion bodies, we have frequently observed large, vacuolated, and green amoeboid bodies in both stem epidermis and chlorenchymatous tissues. Their presence seem to be significant in that they show clearly the fusion of chloroplasts, which is thought to be a fundamental phenomenon in the establishment of inclusion bodies.

Fig. 17. Loosely bound plastids (pale green chloroplasts) aggregating at the both sides of the nucleus (stem epidermal cells of pea).  $\times 560$ .

Fig. 18. Aggregation of numerous plastids. (a) compact mass of plastids, (b) nucleus.  $\times 750$ .

Fig. 19. Enlargement of a part of Fig. 18.  $\times 1270$ .

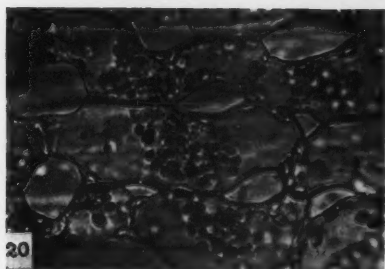
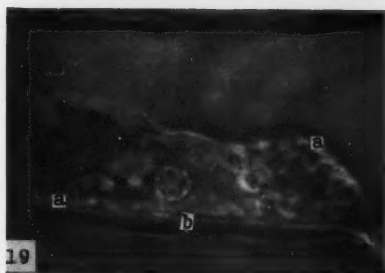
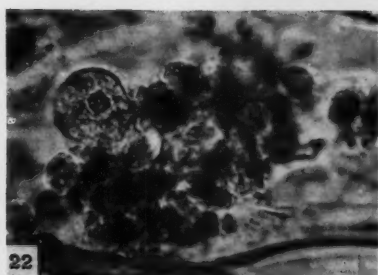
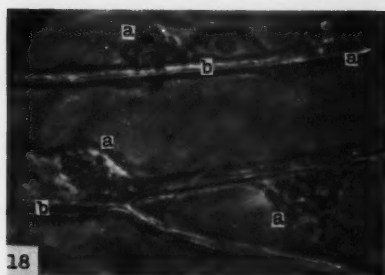
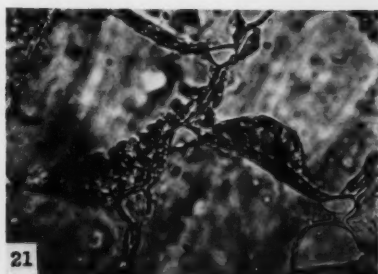
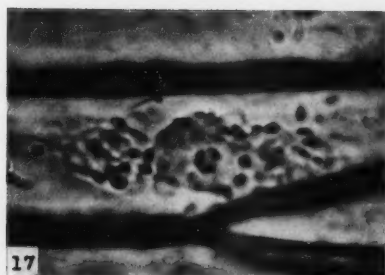
Fig. 20. Chloroplasts aggregating near the nuclei (chlorenchymatous cells of pea).  $\times 410$ .

Fig. 21. Masses of chloroplasts forming inclusion bodies.  $\times 410$ .

Fig. 22. Chloroplasts aggregating near the nucleus.  $\times 1650$ .

Fig. 23. A chloroplast transforming to a nearly colourless body.  $\times 940$ .

Fig. 24. Inclusion bodies containing many fragments of the green pigment.  $\times 940$ .



## Intranuclear inclusions caused by virus 2

Intranuclear inclusions have been described in about 30 different virus diseases of animals, while they have been reported much less frequently in plants. Kassanis (1939) and Bawden and Kassanis (1941) reported crystalline inclusions in the nuclei of solanaceous plants infected with severe etch or mild etch virus.

McWhorter (1941a) observed crystalline inclusions in both cytoplasm and nuclei of leguminous plants infected with either *Pisum* virus 2 or *Phaseolus* virus 2. Woods and Eck (1948) found polymorphous inclusions in the nuclei of tobacco plants infected with a strain of tobacco mosaic virus.

It is easier to trace the development of intranuclear inclusions than that of cytoplasmic inclusions, because the former are produced in almost every nucleus and the site of their occurrence can therefore be readily located. In this section we deal with development of the intranuclear inclusions caused by the virus 2, studied by ordinary and phase contrast microscopes and by staining with IKI solution.

In water mounts nuclei of normal cells have homogeneous or faintly granular contents, and the nucleolus typically appears as a spherical body with no visible internal structure (Figs. 25, 29).

At about stage, when cytoplasmic inclusion bodies become detectable for the first time, the nucleoli swell, becoming two or three times the normal size (Figs. 26 and 30).

As the nucleoli increase in size, refractive rims with some thickness become visible: under phase contrast microscope the rims are bright rather stronger than the centres (Fig. 26), and even under light microscope they appear distinctly solid (Fig. 27).

Later a few minute granules occur at the rims. Up to now, the enlarged nucleoli usually still maintain their spherical form, although occasionally they appear to be broken into several fragments.

The enlarged nucleoli further increase in size, and become more and more granular and refractive, particularly at the rims. Later the rims become filled granules, and finally appear to be broken up into masses of granules. At this stage granules are seen even in the centres of the nucleoli (Figs. 31, 32).

Fig. 25. A nucleus and its nucleolus of a healthy cell under the phase contrast microscope.  $\times 1610$ .

Fig. 26. An enlarged nucleolus in an infected cell.  $\times 2600$ .

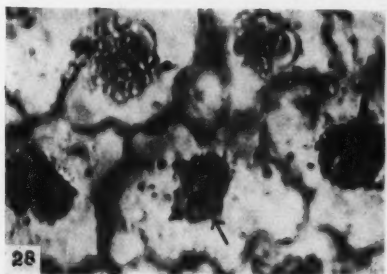
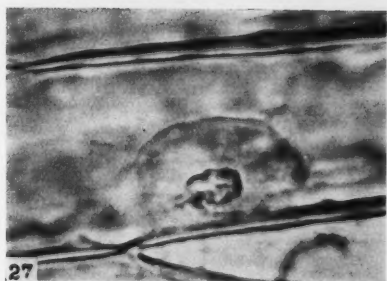
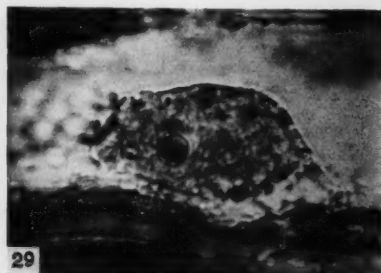
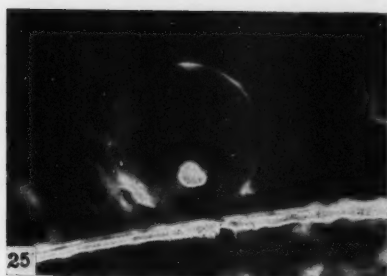
Fig. 27. An enlarged nucleolus under the light microscope.  $\times 2100$ .

Fig. 28. An intranuclear crystalline inclusion of epidermal cells of the inflorescence.  $\times 600$ .

Fig. 29. A nucleolus of a healthy cell stained and fixed with IKI solution.  $\times 2100$ .

Fig. 30. An enlarged nucleolus stained with the same solution.  $\times 2100$ .

Fig. 31, 32. Developed intranuclear inclusions.  $\times 2100$ .



A typical intranuclear inclusion is therefore formed by substitution of a mass of granules for the nucleolus. It grows so large as to occupy most of the nucleus, being always separated clearly from the karyoplasm, which decreases in proportion. This is well demonstrated by the Feulgen reaction, because the inclusions give a negative reaction throughout the course of the development, only the nuclear membrane giving positive reaction. In this connection it would be worthwhile to note that such a nucleus, containing a developed inclusion, is easily shrunk, so that it become invisible, leaving only the inclusions, when the cell is damaged, for instance, by slight pressure from the cover glass. Also, it is sometimes observed that a nucleus containing an inclusion has become extremely vacuolate. These facts suggest the changes are not confined to the nucleolus and that the entire nucleus of each infected cell underwent profound modification.

Usually the intranuclear inclusions appear to be a mass or masses of minute granules. However, in the epidermal cells of the inflorescence, apparently crystalline inclusions occur frequently (Fig. 28).

It is difficult, therefore, to distinguish between a normal and an enlarged nucleolus and between an enlarged nucleolus and a fully developed inclusion. This is in contrast with the findings of Kassanis (1939), Bawden and Kassanis (1941), and Woods and Eck (1948): who all stated that except for the presence of these crystalline inclusions the nuclei appeared normal and still contained nucleoli. All of these facts, together with the occurrence of the intranuclear crystals reported by McWhorter (1941a) and the suggestion by Rich (1948a) that they might develop from nucleoli, may indicate that intranuclear inclusions caused by different viruses each have their own peculiar origin depending upon the particular virus and host-plant. However, it seems reasonable to assume that at any rate the inclusions we have studied originated from nucleoli.

#### Simultaneous occurrence of the three kinds of inclusions in the same cells

McWhorter and Price (1949) were the first to describe evidence for the simultaneous multiplication of two different viruses in the same cell, when they observed both intranuclear and cytoplasmic inclusions in the cells infected with two viruses. So far as we know, there has hitherto been no evidence for the simultaneous formation of two kinds of cytoplasmic inclusion in the same cells infected with two viruses.

The discovery of a virus that causes inclusion bodies of a characteristic form, "corner inclusion bodies," makes it possible, to see whether or not two kinds of cytoplasmic inclusions are formed in the same cytoplasm.

White clover infected naturally with the present two viruses offers a very suitable material for such a study.

Strips fixed and stained with IKI solution or stained with toluidine blue were used.

Generally many cells contain either of the two cytoplasmic inclusions, and two groups of these cells which contain only one kind of cytoplasmic

inclusion body are distributed somewhat in a mosaic. As far as we have observed, inclusion bodies caused by the virus 1 are produced more abundantly than that by the virus 2.

It is by no means difficult, however, to detect cells containing the three kinds of inclusion simultaneously as shown in Fig. 16.

Usually such cells are seen in a boundary region between the two groups of the cells. In such a cell, each kind of inclusions is almost the same state as when it occurs alone: an intranuclear inclusion in a nucleus, a granular cytoplasmic inclusion body near a nucleus, and "corner inclusion bodies" adhering to corners of the cell.

So far as we have observed, any new or the complex type of inclusion body has never been found yet.

The above mentioned observation leads to the suggestion that the two leguminous viruses are possible to multiply anyhow in the same cytoplasm, but are difficult or impossible to multiply simultaneously in the same plastids.

#### Staining and cytochemical tests

*Staining properties.*—The Giemsa method described by Bald (1949) for selective staining of virus inclusions was employed.

Strips were fixed with Lugol's iodine and stained with Giemsa and Orange G. Both cytoplasmic and intranuclear inclusions caused by virus 2 were stained violet, while cytoplasm and nuclei stained green-blue, and plastids green-yellow.

The nucleoli of healthy cells were also stained violet. Sometimes in infected cells bodies resembling plastids were stained the same colour as the inclusion bodies. "Corner inclusion bodies" caused by virus 1 were not stained well.

Vital staining with trypan blue, as described by McWhorter (1941 b) and by Rich (1948 b) was tried for these inclusions, using material fixed in Carnoy's fluid or in 10% formaline. The results were unsatisfactory, all plastids in both healthy and infected tissues being stained equally.

With Erythrosin and Acid fuchsin, again used on strips fixed in Carnoy's fluid or in formaline, all the inclusions were stained intensely, but there was no differentiation of the several types.

*Cytochemical tests.*—1. *Starch.*—The foregoing observations suggest that each of the two kinds of cytoplasmic inclusion bodies develop principally from plastids. It is of interest, therefore, to see whether or not these bodies still contain starch or preserve the ability to condense starch. Since the fixative of Bald's method (1949) is Lugol's solution, it is possible to see whether the entities stained brown with this fixative are the same as the inclusion bodies stained violet with Giemsa. In infected epidermal cells only inclusion bodies were stained brown with iodine, and they did not stain blue or purple, the colour of starch.

In a further test, strips soaked in 2 per cent sucrose solution for 48 hours in the dark were mounted in a dilute solution of iodine potassium iodide. Under these conditions the iodine acted not only as an indicator of starch

but also as a partial fixative, preserving cellular structures. All inclusion bodies, initial ones as well as fully developed ones, were stained brown, while cytoplasm and nuclei stained yellow. Of course, intact plastids were stained blue or purple, though the staining was much lighter than that of the chloroplasts of the guard cells. Even in the early stages of formation of the inclusion bodies, plastids aggregating near the nuclei (virus 2) or adhering to corners of the cell (virus 1) were stained brown, never blue or purple. It was thus not possible by means of this colour reaction to see a transitional stage from normal plastids to "viroplastids."

The enlarged nucleoli and the intranuclear inclusions were also stained brown, and, as far as we examined, this was the only colour reaction that distinguished them from normal nucleoli, which stained yellow. These observations indicate that accumulated starch are lost in the plastids which are developing to inclusion bodies.

2. *Fat*.—As strips fixed in 10 per cent formalin were not stained enough with Sudan III, a solution of iodine potassium iodide was tested for a fixative and found to be useful. Strips fixed in it were washed with a dilute solution of sodium thiosulphate and stained with Sudan III for 10 or 30 minutes. The two kinds of cytoplasmic inclusion bodies were stained red.

Extraction tests were then made. Strips fixed and washed and stained as described were placed in 90 per cent alcohol, ether, chloroform, and in distilled water (control) for 3 days. Even when they had been deeply stained, inclusion bodies were hardly stained, while after treatment in solvents, the control strips remained strongly coloured. Nuclei of healthy cells and intranuclear inclusions were not stained satisfactorily by this method.

3. *Protein*.—The following protein tests were repeatedly applied to inclusion bodies, mainly according to Lison (1953): The Xanthoproteic test for tyrosine, phenylalanine or tryptophane; Millon's reaction (Serra et Lopes); Prussian blue test (Chèvremont et Frédéricq); the Berg ninhydrine test; Biuret reaction; the Thomas arginine test. The first three gave clear positive results, the others were negative or uncertain. These results provide some evidence for the proteinaceous nature of these inclusion bodies.

4. *Phenols*.—The Lison's modification of the chromaffine reaction was tried, which has proved to be applied to ortho- and para-polyphenols, polyamine, and aminophenols. Fresh strips were treated with 3 per cent solution of potassium dichromate or potassium iodide for 30 minutes and mounted in glycerine. A brownish colour indicating a positive reaction appeared round inclusion bodies.

5. *Desoxyribonucleic acid*.—The Feulgen reaction was tested on strips fixed in Nawashin's fluid, paying particular attention to the reaction of nuclei containing an intranuclear inclusion. Only nuclei were stained red: all normal nucleoli, enlarged nucleoli, intranuclear inclusions, and the two kinds of cytoplasmic inclusion bodies were not stained. The larger the

intranuclear inclusions, the less stained were the nuclei, only the nuclear membranes being stained red in the case of fully developed inclusions. It was sometimes observed that distorted nuclei from which an intranuclear inclusion had been extruded remain unstained.

6. *Ribonucleic acid*.—Staining with basic dyes and digestion tests with ribonuclease were carried out. At first, staining of inclusion bodies was tried. Strips fixed in Carnoy's fluid or 10 per cent formaline were stained with pyronine, thionine, toluidine blue, or azure A. All inclusion bodies were stained intensely, particularly with toluidine blue and azure A. Nuclei, cytoplasm, and apparently intact plastids coexisting with inclusion bodies in the same cell were also stained, but much more lightly than the inclusions themselves.

Next, digestion tests with ribonuclease for confirming ribonucleic acid in the inclusion bodies were made. Strips fixed in the same fixative were placed in small glasses containing the enzyme or distilled water without the enzyme (control). The concentration of the enzyme was 0.1 per cent, dissolved in distilled water. The solutions were adjusted to pH 7.0 with M/20 sodium hydroxide and kept at 37° C. for 3 to 5 hours. After treatment the strips were washed with water and stained with the dyes.

As the result of this procedure, the ribonuclease-treated inclusion bodies were stained far lighter than ribonuclease-control ones, which stained densely as well as the untreated ones.

It was also noted that ribonuclease-treated cytoplasm and cell walls always appeared lighter in colour than the control, suggesting that the enzyme might act on components other than ribonucleic acid. The above results provide some evidence for the presence of ribonucleic acid in the inclusion bodies.

Two alternative but not mutually exclusive explanations for its presence can be considered.

The first is, and perhaps less probable, explanation is that the ribonucleic acid became detectable owing simply to the disintegration of plastids, which have been proved to contain it. The second is that it is closely related to abnormal synthesis of virus protein in plastids.

Considering the preceding observations which suggest that "viroplastids" or inclusion bodies are not merely disintegrated products but are peculiarly modified plastids, the ribonucleic acid would be an important substance taking part in the synthesis of virus protein, and it might have become detectable owing both to structural modification of plastids and because there would be more of it present during virus synthesis.

It is not known whether the ribonucleic acid is some moiety of virus nucleoprotein, or whether its appearance precedes that of virus protein as described by Basler (1955) for the tobacco mosaic virus.

### Conclusions and Discussion

The above results show that the two kinds of cytoplasmic inclusion bodies develop principally from plastids.

An extensive discussion on this problem will be found in Clinch (1932) and Smith (1933). Clinch (1932) pointed out the physical and chemical changes which may occur in the chloroplasts, the marked abnormalities in starch content in chlorotic cells and fatty degeneration which is also evident in them can scarcely be attributed to retarded development only. Smith (1933) stated that virus appeared to have a stimulatory rather than inhibitory effect upon the development of chloroplasts. We have seen abnormal starch accumulation in parenchymatous cells at or near the leaf veins infected with the two viruses, but no such plastids have been seen in epidermal cells. From these facts it seems that the metabolic aberration of plastids due to virus infection might vary widely, depending upon the virus and the host. Sometimes there is an increased production of starch, sometimes of fat, and sometimes of anomalous protein. The last case may involve the synthesis of virus protein in plastids of the epidermal cells.

As regards the structural modification of chloroplasts caused by virus infection, Woods and Du Buy (1951) have found that normal-sized grana were replaced by large stratified green disc-shaped ones, and finally the large grana began to disintegrate and the whole plastid was transformed into colourless, or nearly colourless, vacuolar form.

Smith (1933) described acute virus infections in which chloroplasts might break up into small hyaline granules, and chloroplasts full of starch might burst.

In the recent papers, De Rezende-Pinto (1954, 1955) who has postulated the chloroplastonematous structure, stated that excess traumatization affected the chloroplast and reduced it to a shapeless mass. He considered that the treatment influenced the colloidal state of the plastidal gel, particularly that of the stroma, and that chloroplast swelling led to separation of the chloroplastonemata. His suggestion is of interest compared with the plastid vacuolation produced by virus infections. That is to say, the vacuolated or shapeless plastids may be in a hydrolized state which may be associated either with their own decomposition or with the synthesis of virus protein.

We must now turn to discuss the significance of the cytochemical nature of the inclusion bodies. There can at present be no certainty that the chemical substances shown to be located in the inclusions have not lodged them after circulation around the cell. However, it is possible in the present case to use the intranuclear inclusions as a control. As Bald (1948) stated, "A priori, there seems less chance of virus particles passing through a membrane or phase boundary and of being concentrated passively in an organelle in which they were not formed, than of virus particles concentrated in an organelle where they are being formed."

The result showing disappearance of starch and loss of the assimilative function agrees with Bald (1948), suggesting an aberration of plastid metabolism.

As to the presence of fat, the lipid content of the stroma and grana has definitely been proved (Frey-Wyssling 1953).

The histological and chemical studies on the distribution of ribonucleic acid in different tissues by Brachet and the microspectrophotometric researches of Caspersen *et al.* have led to the recognition of a constant coincidence in space and time of a high content of ribonucleic acid and rapid protein formation (Chantrenne 1953). On the other hand, Bawden and Pirie (1953) have always emphasized that virus infection should be looked on as a general anomaly of the nucleoprotein metabolism of the host rather than as the growth of a parasite on the host.

From these points of view, it is quite possible that the chemical substances shown in the inclusion bodies are closely related to the synthesis of the anomalous nucleoprotein, involving more or less virus nucleoprotein. Summing up the above mentioned results, we think that they are illustrative of the hypothesis postulated by Bawden and Pirie (1953).

"From this some possible generalizations emerge. If a protein without any nucleic acid prosthetic group is being made at a nucleoprotein surface, there must come a time when it parts company with the surface. Normally the protein comes away free, but the protein retains the nucleic acid more strongly than does the stroma protein. After synthesis, therefore, part of the machinery comes away instead of only the product.

Compatible with this idea, though hardly to an extent that would justify calling it evidence, is the fact that in many viruses the union between the protein and nucleic acid is exceptionally strong. Thus nucleic acid, which is presumed to be initially present as nucleoprotein, can be extracted from normal tissues and from isolated microsome or microsome fragments with salt or acid that do not separate it from such viruses as tobacco mosaic. ... If such a substance, let say a nucleoprotein, is normally part of an insoluble structure where it is needed and where it remains, its direct effect can operate only in its immediate neighbourhood." Is it too much to suggest that the process of development of inclusion bodies, particularly that of the intranuclear inclusions is illustrative of their hypothesis?

Our observations demonstrate clearly the origin and formation of both cytoplasmic and intranuclear inclusions. These findings are in accord with the results obtained by Bald (1948) and by one of the authors (1955). Thus it is now possible to build up a generalised picture of development of cytoplasmic inclusion bodies from plastids. The presence of two kinds of intranuclear inclusions, one within the nucleolus, the other outside it, may suggest that the origins of inclusions and consequently the sites of multiplication of different viruses are not all the same but differ to some limited extent. Such a condition may be the same even within the cytoplasm.

The use and limitation of the staining technique depend fundamentally on the manner and the site of virus multiplication. The present study leads to the hypothesis that virus multiplies in plastids or nucleoli. However, some cases may be supposed that virus multiplies in minute par-

ticles such as microsomes, and then this technique would be useless, for it would be impossible to detect by staining small amounts of virus scattered throughout the cytoplasm.

For the same reason, we are also led to the assumption that, so far as our materials concerned, there would be no site of virus multiplication other than the plastids or nucleoli.

This idea is against the general conception that virus may multiply in such minute particles as microsomes. The conception is based upon the fractionation of virus by centrifugation. However, the presence of virus in these particles after experimental treatment does not always mean that the virus is distributed there in the living cell. For, if plastids in which virus is multiplying undergo the grinding and centrifuging, they should be readily disintegrated into the minute particles indistinguishable from microsomes.

Recently H i d a k a (1955) has found that virus-like filaments are strictly localized in the plastids and sometimes they appear to have flowed out into cytoplasm.

We shall consider the reason why most inclusion bodies occur particularly in the epidermis. We should like to draw attention to the recent works reporting that epidermal cells contain much higher concentration of virus than other tissues of the leaf.

B a w d e n, H a m l y n and W a t s o n (1954) have found such cases with cabbage black ring spot virus and henbane mosaic viruses. B r a n d e s (1955) has found that the potato bouquet (tobacco ring spot) virus appeared to be localized principally in the epidermis, and that the virus occurred mostly in the form of cell inclusions, presumably X-bodies. Seeing these facts, the authors are inclined to think that viruses that readily multiply in epidermal cells cause a great number of the bodies in the cells, while chloroplasts in the mesophyll have something to resist virus multiplication so that only few bodies occur in these cells, exception for some viruses that multiply abundantly even in these cells.

Let us now consider the significance of virus inclusion bodies. B a w d e n (1950) has suggested an explanation based upon the fact that some purified viruses readily form a complex with other substances. He suggested that inclusion bodies were the result of the operating of a protective mechanism, when though, as he noted, there is no valid evidence that plants contain or produce antibodies. We should like to regard inclusions as aggregated bodies of modified cell constituents or unusual structures in which anomalous proteins are being formed, including virus protein. In our opinion, virus contained in inclusion bodies is attached to the centres at which it was reproduced, namely, to the plastids or nucleoli.

As L e y o n (1953) has stated, the idea that virus may multiply in plastids is not new. K a u s c h e and R u s k a (1940), K a u s c h e (1940) and R i s c h k o v and S m i r n o v (1940) have shown that chloroplasts of tobacco mosaic-infected plants actually contained virus protein, and suggested the

existence of fundamental relationship between virus protein synthesis and plastids. Woods and Du Buy (1941) have reported extensive works on this problem from some different aspect.

Recently, Black, Morgan and Wyckoff (1950) and Leyon (1953) have published work suggesting virus formation in plastids. However, there is not yet sufficient evidence to prove whether the virus is produced in plastids or it is attached to them after synthesis elsewhere in the cell.

Concerning this important point, the most recent electron microscopic studies by Hidaka (1955) and by Stahmann and Kaesberg (1955) are of great significance. Although complete interpretation of their electron microscopic pictures is not yet possible, they are in accord with our own observations and suggest that some plant viruses do multiply in plastids.

### Summary

Two hitherto undescribed viruses were isolated from naturally-infected white clover plants.

One induced both cytoplasmic and intranuclear inclusions, and the other caused cytoplasmic inclusions of a new type, which we have called "Corner inclusion bodies."

All three kinds of inclusion were found in the same cells.

Vital observations showed that the two kinds of cytoplasmic inclusion bodies developed principally from the plastids.

The intranuclear inclusions were shown to develop from the nucleoli.

Cytochemical tests showed that the cytoplasmic inclusions contained protein and ribonucleic acid.

On the basis of these findings, the possibility of virus synthesis in plastids and nucleoli is discussed.

### Literature

- Bald, J. G., 1948: The development of amoeboid inclusion bodies of tobacco mosaic virus. *Australian J. Sci. B* 1, 458—463.
- 1949: A method for the selective staining of viruses in infected plant tissues. *Phytopath.* 39, 395—402.
- Basler, E., 1954: Relation between the nucleic acids of tobacco leaf and the biosynthesis of tobacco mosaic virus. *Diss. Abstr.* 14, 1509—1510.
- Bawden, F. C., 1950: *Plant Viruses and Virus Diseases*, 3rd Ed. Waltham, Mass. p. 45—46.
- and B. Kassanis, 1941: Some properties of tobacco etch viruses. *Ann. Appl. Biol.* 28, 107—118.
- and N. W. Pirie, 1953: Virus Multiplication Considered as a Form of Protein Synthesis, in: *The Nature of Virus Multiplication* (Fildes and Heyningen Eds). Cambridge, p. 21—45.
- B. M. G. Hamlyn, and M. A. Watson, 1954: The distribution of viruses in different leaf tissues and its influence on virus transmission by aphids. *Ann. Appl. Biol.* 41, 229—239.

- Black, L. M., C. Morgan, and R. W. G. Wyckoff, 1950: Visualization of tobacco mosaic virus within infected cells. *Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. (Am.)* 73, 119—122.
- Brandes, J., 1955: Elektronenmikroskopischer Nachweis von Pflanzenviren in ihren Wirtszellen. *Naturw.* 42, 101.
- Chantrenne, H., 1953: Problems of Protein Synthesis, in: *The Nature of Virus Multiplication* (Fildes and Heyningen Eds.). Cambridge, p. 1—20.
- Clinch, P., 1932: Cytological studies of potato plants affected with certain virus diseases. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. n. s.* 20, 143—172.
- Frey-Wyssling, A.: 1953: *Submicroscopic Morphology of Protoplasm*. Elsevier Publ. Company, p. 247.
- Glick, D., 1949: *Techniques of Histo- and Cyto-chemistry*. Interscience Publ.
- Hidaka, Z., 1955: Personal statement to the authors.
- Holmes, F. O., 1948: The filterable viruses, in: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6th ed., William and Wilkins Co.
- Kassanis, B., 1939: Intranuclear inclusions in virus-infected plants. *Ann. Appl. Biol.* 26, 705—709.
- Kausche, G. A., 1940: Ergebnisse und Probleme der experimentellen Virusforschung bei Pflanzen. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 58, 200—22.
- and H. Ruska, 1940: Über den Nachweis des Tabakmosaikvirus in den Chloroplasten viruskranker Pflanzen. *Naturw.* 28, 303—304.
- Koshimizu, Y., 1955: Leucoplasts as an origin of intracellular inclusions and site of virus reproduction. Abstracts of papers presented at the Annual meeting of the Phytopath. Soc. Japan held on April 1955 (Japanese).
- Leyon, H., 1953: Virus formation in chloroplasts. *Exper. Cell Res.* 4, 362—370.
- Lison, L., 1953: *Histochemie et Cytochemie Animales* (Japanese trans. by Imaizumi).
- McWhorter, F. P., 1941 a: Isometric crystals produced by *Pisum* virus 2 and *Phaseolus* virus 2. *Phytopath.* 31, 760—761.
- 1941 b: Plant-virus differentiation by trypanblue reactions within infected tissue. *Stain Technol.* 16, 143—149.
- and W. C. Price, 1949: Evidence that two different plant viruses can multiply simultaneously in the same cell. *Science* 109, 116—117.
- Rezende-Pinto, M., 1955: Sur les modifications de l'état colloïdal des chloroplastes. *Brotéria (C. N.)* 24, 52—55.
- and A. Lemos-Pereira, 1954: On the chloroplastonemetic and optical structure of *Closterium* chloroplasts. *Portug. Acta Biol. (A)* 4, 1—4.
- Rich, S., 1948 a: The chemical nature and origin of *Phaseolus* virus 2 crystalline inclusions. *Science* 107, 194.
- 1948 b: A rapid stain method for detecting certain plant virus inclusions. *Stain Technol.* 23, 19—20.
- 1949: Some relations between *Phaseolus* virus 2 and its associated crystalline inclusions. *Phytopath.* 39, 221—224.
- Rischkov, V. L., and V. A. Smirnova, 1940: The tobacco mosaic virus content of tomato plastids. *Mikrobiol.* 9, 170—181.
- Sheffield, F. M. L., 1931: The formation of intracellular inclusions in solanaceous hosts infected with aucuba mosaic of tomato. *Ann. Appl. Biol.* 18, 471—493.
- Smith, K. M., 1933: Recent advances in the study of plant viruses. *Churchill Co.*, p. 26—41.

- Stahmann, M. A., and P. Kaesberg, 1955: Concepts and problems concerning the electron microscopy of plant viruses. *Phytopath.* 45, 187—195.
- Weber, F., I. Thaler, and G. Kenda, 1954: Die Plastiden der *Cleome*-Epidermis. *Österr. Bot. Z.* 102, 84—88.
- Woods, M. W., and H. G. Du Buy, 1941: Synthesis of tobacco mosaic virus protein in relation to leaf chromoprotein and cell metabolism. *Phytopath.* 31, 978—990.
- and H. G. Du Buy, 1951: The action of mutant chondriogenes and viruses on plant cells with special reference to the plastids. *Amer. J. Bot.* 38, 419—434.
- and R. V. Eck, 1948: Nuclear inclusions produced by a strain of tobacco mosaic virus. *Phytopath.* 38, 852—856.

## The Influence of Distilled Water on the Fluidity of Protoplasm

By

M. G. Stålfelt

Department of Plant Physiology, University of Stockholm

With 3 Figures

(Received May 18, 1956)

It has earlier been shown (1948, 1949) that sea water, tap water deriving from the soil, or that has been in contact with decomposing parts of plants, contains substances which raise the protoplasmic viscosity of leaves of *Helodea densa* (decrease the fluidity of the plasma). If leaves that have lain in such water are transferred to distilled water, a decrease in the protoplasmic viscosity follows. The substances derive from plants, and are present in leaves, fruits, seeds and underground storage organs, as well as in recently fallen leaves and other kinds of fresh litter. These substances are resistant to boiling, but are probably broken down slowly by the soil microorganisms. A phenomenon closely related or similar to these changes in viscosity was demonstrated earlier by Umrath (1942). He found that the mobility of the chromatophores (on centrifugation) in *Spirogyra* was increased if the cells were placed in an extract produced by boiling the same kind of algae.

Another example has been reported by Jeremias (1956), who studied the protoplasmic viscosity in frost-hardened plants (wheat). In similarity to Kessler (1935) and Kessler and Ruhland (1938), Jeremias found the viscosity to be higher in the hardened plants. Jeremias compared the water extract of hardened and unhardened objects, using *Helodea* as the test plant. The plasmatic viscosity of the *Helodea* cells was increased in extracts from hardened objects, but decreased in extracts from unhardened. Moreover, the protoplasmic viscosity of the epidermal cells of unhardened wheat plants increased when they were placed in extracts from frost-hardened plants.

*Helodea densa* has hitherto been the only object on which the effect of distilled water in this respect has been tested; the experiments have therefore been extended to the investigation of terrestrial plants as well.

### Material and Methods

The *centrifuge method* was used for measurement of the protoplasmic fluidity; the procedure was essentially the same as in the experiments with *Helodea*. Certain modifications were, however, necessary in view of the differences between the structure of *Helodea* leaves and that of the leaves of most of the other plants used.

Owing to the relatively simple structure of the *Helodea* leaf—only two layers of cells between both layers of epidermis—this object provides a clear picture of the position of the centrifuged chloroplasts. In most phanerogams, the picture is disturbed by the more complicated anatomic structure, particularly the presence of structures in the walls and cuticle of the epidermal cells. Only few terrestrial plants give satisfactory information. In the present experiments, use was chiefly made of *Achillea millefolium*, *Chenopodium album*, *Rumex acetosella* and *Ficaria verna*. The leaves of these plants are sufficiently large to provide the number of samples necessary for an experimental series. The centrifuged chloroplasts appear distinctly in the microscope.

The objects in question necessitated certain modifications in the method. The fluidity of the protoplasm in the leaf cells of terrestrial plants is lower than in the cells of *Helodea*; a stronger centrifuge was therefore required. Moreover, it has been shown earlier (1954) that the fluidity is not the same in all parts of a leaf, but increases from the margin to the midrib and from the apex of the leaf to the base; it is also affected by the water deficit. The fluidity is usually greatest in the middle leaves on a stem or shoot, and lower in young leaves inserted high up and in basal leaves with signs of incipient destruction (e.g. attacks by fungi).

In order to avoid these variations in the material, the experiments were performed as follows. Leaves of the same age and with the same position on the shoot were cut off and placed in darkness in a humid chamber for 12 hours, so that the cells became saturated with water. Some leaves were placed in distilled water, others in well water or in a nutrient solution. The leaves were then exposed to transpiration; this was raised by exposing them either to sunlight or to a stream of dry air.

Samples for centrifugation were taken simultaneously from 8 experimental leaves and from 8 controls. The *samples* consisted of small pieces of a leaf (about 5 by 10 mm.) or of leaflets. Each sample was placed between two plexiglass slides and inserted in the centrifuge. The centrifuge was specially constructed for the purpose, and had 16 tubes placed horizontally. All the experimental samples and controls were centrifuged simultaneously. The sample, still lying between the two slides, was then fixed immediately in boiling water for 1 minute, and examined in a dissecting microscope. The rate of centrifugation was such that only some of the chloroplasts in the controls were displaced. This quantity was determined, as in earlier investigations, by estimation according to a 5-grade scale, a 10-grade scale being used for the highest and lowest values.

The water deficit was determined by weighing the leaves before and after each sampling. In those cases in which there was a disparity between the water deficit in the experimental leaves and in the controls, the values were corrected according to the earlier established relation between plasmatic fluidity and water deficit (1954).

By cutting off part of the blade of the leaves, the requirements for the water uptake through the cut surface were diminished; the leaves were therefore able to retain their turgor even during intense transpiration.

### Experimental

The results of several experiments with four different plant species are assembled in Table 1. The pre-treatment was the same in every case. The leaves were excised from plants in the open air, and placed in darkness, well water and saturated moisture for 12 to 14 hours before beginning

Table 1. Protoplasmic fluidity (relative values) of excised leaves that have taken up well water and distilled water, respectively, through the cut surface, and that have transpired.

	Transpiration hrs.	Protoplasmic fluidity (rel. values)		No. of leaves	Exposure
		Leaves in			
		Well water	Dist. water		
<i>Achillea millefolium</i>	50	1	1.8	16 + 16	Darkness
"      "	28	1	1.5	16 + 16	"
"      "	88	1	1.6	16 + 16	"
"      "	41	1	1.6	16 + 16	"
"      "	50	1	1.9	16 + 16	In lab. (room light)
"      "	68	1	2.1	8 + 8	In lab. (room light)
"      "	10	1	2.0	8 + 8	Open air, clear, sunny
<i>Chenopodium album</i>	10	1	1.6	8 + 8	Open air, clear, sunny
<i>Rumex acetosella</i>	88	1	2.9	12 + 12	In lab.
"      "	100	1	2.1	12 + 12	"
<i>Ficaria verna</i>	6	1	1.2	16 + 16	Open air, cloudy
"      "	6	1	1.8	16 + 16	"      sunny
"      "	6	1	2.2	16 + 16	"      "

the experiment. Each experimental series comprised 32 leaves (in 3 series 16 leaves only). Half of them (controls) were allowed to continue to imbibe well water; the other half (experimental leaves) were placed in distilled water. Some experiments were performed in darkness, some in room light and some in full sunlight.

In all the experiments, the protoplasmic fluidity was greatest in the objects that had taken up distilled water. The experiments also seemed to indicate a relation between the results of centrifugation and the quantity

of water utilized through transpiration, or the intensity of transpiration. In order to make a closer analysis of this relation, experiments were made in such a way that the changes could be determined at fixed time intervals. An experiment of this kind is recorded in Fig. 1. It can be inferred that the protoplasmic fluidity increased rapidly in leaves allowed to transpire in strong sunlight. The maximum fluidity was reached after 6 to 8 hours, and was about twice as large as that of the control leaves and, consequently, of the same order of magnitude as in most of the experimental leaves in Table 1.

Fig. 2 shows the changes in protoplasmic fluidity in the leaves of *Rumex acetosella* in the course of 90 hours. The material was kept in darkness during the whole period. Transpiration was weak; the difference between the experimental and the control leaves therefore increased slowly. It was necessary to make the sampling at long intervals, so that each leaf would suffice to provide the samples that were taken on each occasion. After 28 hours, transpiration was interrupted by placing the leaves in a moisture-saturated chamber. The difference between the experimental leaves and the controls occurring during the first 28 hours was due to a change in the former, in which the fluidity had increased. During the subsequent 62 hours, when no transpiration took place, and practically no uptake of water, the value fell slowly and regained that of the control leaves.

The course of the difference was the same in similar experiments with other species, i.e. the fluidity increased when the leaf took up distilled water owing to transpiration, but started to fall and to return to the value of the controls as soon as transpiration ceased and the leaf was saturated with distilled water. The return to the values of the control leaves generally required several hours or even days.

In the experiments recorded in Fig. 3, distilled water was replaced by nutrient solutions prepared from distilled water and a number of salts. Hoagland's solution was used; it was prepared according to the formula given by Paech and Simonis (1952, p. 243). Solution a contained

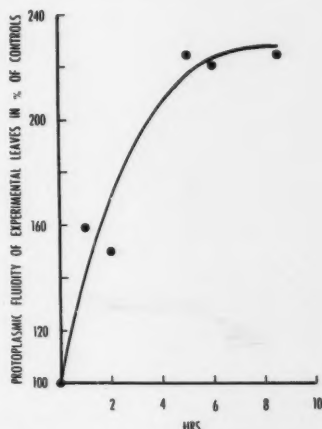


Fig. 1. Protoplasmic fluidity in excised leaves, that had stood in well water and in distilled water, respectively, and in direct sunlight. Each value is the mean for 16 experimental leaves (distilled water) or for 16 controls (well water). Ordinate: Fluidity of the protoplasm of the experimental leaves expressed as a percentage of that of the controls (fluidity of controls = 100). Abscissa: Time of transpiration and light in hours. Before exposure to transpiration and light, the leaves had remained in darkness and saturated moisture for 14 hours. *Achillea millefolium*.

12 microelements in addition to the usual nutrient salts, and solution *b* also contained 12 (selenium and vanadium were lacking).

Series 1-3 in Fig. 3 were performed in sunlight, and series 4 in darkness. In series 4, transpiration was increased by air from a fan. The results of series 4 did not differ from those in the other series, except that the transpiration period was longer, which resulted in a greater difference between the experimental and the control leaves. In series 4, the water uptake was measured concurrently with the removal of samples for centrifugation. It was found that the experimental leaves gave off a quantity

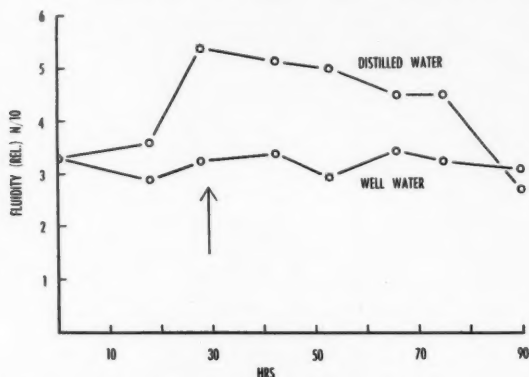


Fig. 2. Changes in the fluidity of the protoplasm in excised leaves that had taken up well water and distilled water, respectively. Each value is the mean for 16 leaves. Fluidity (rel.)  $N/10$  = quantity of displaced chloroplasts in relation to total number of chloroplasts in the cells. Abscissa: Duration of experiment in hours. — When the leaves had transpired for 28 hours (arrow), they were placed in a moisture-saturated chamber. Experiments made in darkness. *Rumex acetosella*.

of water that was 2.9 times greater than their own, and that the value for the controls was 2.0. During the transpiration period, a water deficit occurred, but it was almost the same in the experimental leaves and in the controls; the difference was less than 1 per cent of the fresh weight of the leaves.

In all the experiments shown in Fig. 3, the protoplasmic fluidity of the experimental leaves increased as long as transpiration proceeded, and fell when it ceased. Consequently, the salts added to the distilled water were unable to inhibit its effect on the fluidity.

Whether or not distilled water has the same effect on rooted plants was not investigated.

### Discussion

The experiments have shown that distilled water produces an increase in the protoplasmic fluidity of the leaf cells of terrestrial plants in the same

way as in the cells of *Helodea*, investigated earlier. The change was as apparent in material kept in darkness as in that kept in light; consequently, it cannot have been due to photic processes. Nor can it be ascribed to the absence of salts, i.e., ordinary nutrient salts and microelements. In this respect as well, the changes are in agreement with those exhibited by *Helodea*. The cause must therefore be sought in the fluidity-active substances present in the soil fluid (e.g. well water, lake water), of which the

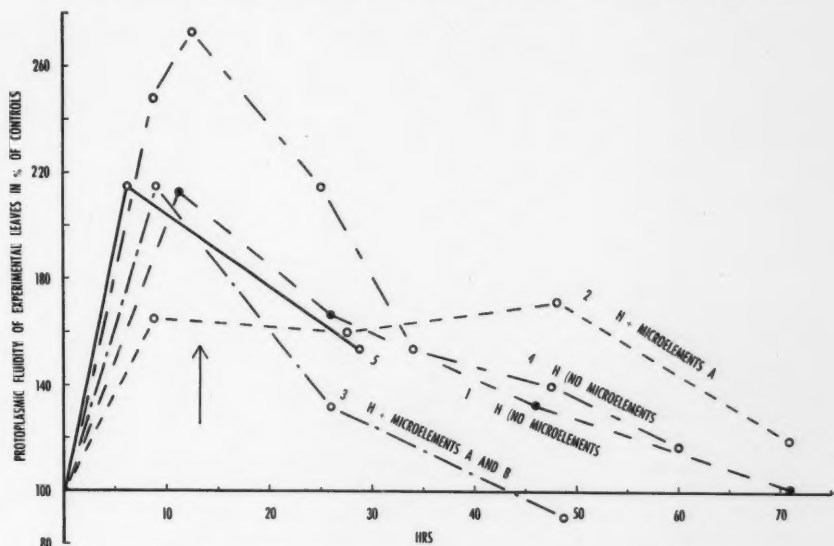


Fig. 3. Comparison between changes in the protoplasmic fluidity of excised leaves that had taken up distilled water (5), and nutrient solutions prepared from distilled water and various kinds of salts, respectively (Hoagland's solution, according to Paech and Simonis 1952). H = Hoagland's nutrient solution. A = 12 microelements. B = 12 (14) microelements. — During first part of experiment (values to left of arrow) the leaves were allowed to transpire. During later part of experiment (values to right of arrow) the leaves were placed in moisture-saturated air. — Series 1-3 performed in light. Series 4 and 5 performed in darkness; transpiration increased by air (fan). For other data, see Fig. 2. *Achillea millefolium*.

effect on the protoplasm of the leaf cells of *Helodea* was studied previously (1948, 1949).

The only difference between the mode of reaction in *Helodea* and in terrestrial plants is that the leaves of the former react more rapidly, which can be explained by the shorter route of transport. The *Helodea* leaves were immersed in water during the experiments. The leaves of the terrestrial plants, on the other hand, imbibed water through the leaf stalk and leaf cells; on the way, dilution with the cell sap took place, so that the

distilled water did not exert its full effect until after a certain interval. The experiments also showed that the length of this interval depends on the intensity of transpiration; the more intense is transpiration, the more rapidly does the fluidity value change.

Nothing is yet known about the nature of the substances in question. According to earlier analyses<sup>1</sup>, they are probably not auxins, since the active concentrations did not give a positive reaction with the *Avena* test. This does not, however, rule out the possibility that the substances may consist of parts of auxins or of inactive forms of them, formed during microbial breaking down in the soil, and that the cells have resynthesized auxin from these parts. It has been demonstrated earlier (1947) that indole-3-acetic acid changes the viscosity of the plasma, and also that this substance stimulates protoplasmic streaming (Thimann and Sweeney 1937, 1939, Sweeney and Thimann 1942, Thimann, Kelso and Turman 1955). Seifríz (1952, p. 105) has, however, made the experience "that an indubitable, constant, and reproducible increase in streaming rate is rare."

The increased fluidity persists as long as the leaves take up distilled water. When this ceases, the fluidity returns to the normal value, reaching it after one to three days. The cause of the increase in fluidity can be postulated to be inhibition of the supply of fluidity-decreasing soil substances, whereby the cells' own production of fluidity-increasing substances temporarily predominates. It then seems most feasible to interpret the return to normal fluidity as a result of increased production of fluidity-decreasing substances in the cells. The hypothesis of equilibrium between the fluidity-increasing and fluidity-decreasing substances and their regulating action on the labile state of the plasma has been put forward earlier (Stålfelt 1948, 1949, Seifríz 1952).

Numerous cases are known in which the processes of growth have been stimulated or inhibited by certain soil substances. It is true that no proof exists that such effects are a result of a change in the structure of the plasma, but certain indications are found that the causes may be of this nature.

A survey of the cases in which plants, plant extracts or litter have affected development of other plants has been given by Gray and Bonner (1948). Further observations have subsequently been made. Bautz (1953) has shown that extracts of soil and litter, e.g. raw humus and spruce and beech litter, influence the germination of spruce seeds (*Picea excelsa*). Weak concentrations promote germination, strong ones inhibit it. Bublitz (1953) has also stated that water extracts of spruce litter inhibit germination of fir and spruce seeds.

It was demonstrated by Bonner and Galston (1944) and by Bonner (1946) that water or nutrient solution in contact with guayule roots accumulates substances which are toxic to the growth of guayule plants.

<sup>1</sup> I am indebted to Dr. Torsten Hemberg for making these determinations.

One of these substances was identified as transcinnamic acid. Gray and Bonner (1948) have shown that leaves of *Encelia farinosa*, when applied to tomato and other plants in sand cultures, cause a striking inhibition of growth. Water and other extracts of the leaves, when fed to tomato seedlings in solution culture, may cause death of the plants within one day.

According to Winter and Willeke (1952), antibioticly active substances are present in general in water extracts of leaf litter, as well as in extracts from green leaves. The activity was strikingly high in extracts from the *Ericaceae* species. Winter and Bublitz (1953), who made a more detailed study of spruce litter, found that extracts inhibited development of the microorganisms, but that the inhibition ceased and was replaced by a stimulating effect when the extracts were diluted to weak concentrations.

### Summary

It is found that if distilled water is allowed to flow through the leaves of terrestrial plants (*Achillea millefolium*, *Chenopodium album*, *Rumex acetosella*, *Ficaria verna*), the protoplasm of the cells exhibits increased fluidity. The terrestrial plants thus react in the same way as the earlier investigated *Helodea*. The cause is not the absence of nutrient salts or of microelements, since nutrient solutions prepared from distilled water have the same effect. The cause is instead the absence of the fluidity-active substances that have earlier been demonstrated in the soil fluid, and which derive from plants.

The effect persists as long as the leaves take up distilled water, but disappears gradually (after 1–3 days) when the uptake has ceased. It is assumed that the return to the normal fluidity value is due to production of fluidity-decreasing substances by the leaf cells. The changes—the increase in fluidity and the subsequent decrease—suggest the existence of a system of equilibrium, which regulates the fluidity value.

The expenses of the present investigation were defrayed by a grant from the Science Research Council of Sweden.

### References

- Bautz, E., 1953: Einwirkung verschiedener Bodentypen und Bodenextrakte auf die Keimung von *Picea excelsa*. Z. Bot. 41, 41.
- Brian, P. W., 1949: The production of antibiotics by soil microorganisms. Chemistry and Industry 1949, 391.
- and H. G. Hemming, 1947: Production of antifungal and antibacterial substances by fungi. J. gen. Microbiol. 1, 158.
- and H. G. Hemming, 1947: Production of antifungal and antibacterial metabolites of soil microorganisms by plants. Nature 167, 167.
- Bonner, J., 1946: Relation of toxic substances to growth of guayule in soil. Bot. Gaz. 107, 343–351.
- and A. W. Galston, 1944: Toxic substances from the culture media of guayule which may inhibit growth. Bot. Gaz. 106, 185–198.

- Bublitz, W., 1955: Über die keimhemmende Wirkung der Fichtenstreu. *Naturw.* 40, 27.
- Gray, R., and J. Bonner, 1948: An inhibitor of plant growth from the leaves of *Encelia farinosa*. *Amer. J. Bot.* 35, 52.
- Harding, Drusilla, 1951: Initiation of soil division in the *Arbacia* egg by injury substances. *Physiol. Zool.* 24, 54.
- Jeremias, Kurt, 1956: Zur Physiologie der Frosthärtung (unter besonderer Berücksichtigung) von Winterweizen. *Planta* 47, 81—104.
- Kelso, J. M., and J. S. Turner, 1955: Auxin and protoplasmic streaming. *Austral. J. Biol. Sci.* 8, 1, 19.
- Kessler, W., 1955: Über die inneren Ursachen der Kälteresistenz der Pflanzen. *Planta* 24, 312.
- und W. Ruhland, 1958: Weitere Untersuchungen über die inneren Ursachen der Kälteresistenz. *Planta* 28, 159.
- Paech, K., und W. Simonis, 1952: Übungen zur Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1952.
- Seifriz, W., 1952: The Rheological Properties of Protoplasm. In Frey-Wyssling: *Deformation and Flow in Biological systems*, p. 110. Amsterdam 1952.
- Stålfelt, M. G., 1947: Influence of litter extract on the viscosity of protoplasm. *Svensk. Bot. Tidskr.* 41, 391.
- 1947: Effect of heteroauxin and colchicine on protoplasmic viscosity. *Proceedings of the Sixth International Congr. of Exp. Cytology*, Stockholm, (Exper. Cell Research Suppl. 1) 63—78.
- 1948: Soil substances affecting the viscosity of the protoplasm. *Svensk Bot. Tidskr.* 42, 17—35.
- 1949: The lability of the protoplasmic viscosity. *Physiologia Plantarum* 2, 341—349.
- 1954: The relation between the fluidity of the protoplasm and the insertion and function of the leaves. *Physiologia Plantarum* 7, 354—374.
- Tsung-Lê Loo and Shih-Wei Loo, 1935: Studies on the culture of isolated root-tips under sterile conditions. The effect of leaf extract on the growth of root-tips. *Science reports. Ser. B. Biology. Nanking, China*, vol. 2.
- Umrath, K., 1942: Über die Ausbreitung der durch Verwundung bedingten Viskositätsverminderung bei *Spirogyra*. *Protoplasma* 36, 410.
- Winter, A. G., und W. Bublitz, 1955: Untersuchungen über antibakterielle Wirkungen im Bodenwasser der Fichtenstreu. *Naturw.* 40, 345—346.
- und L. Willeke, 1952: Hemmstoffe im herbstlichen Laub. *Naturw.* 39, 45.

## Trichome an Crown-Galls von *Nicotiana*

Von

Friedl Weber

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. Mai 1956)

Die bei Infektion mit *Pseudomonas tumefaciens* am Stamm von *Nicotiana Tabacum* entstehenden Gallen weisen, solange sie jung sind, eine glatte Oberfläche auf, ihre Epidermis ist nur spärlich behaart (Abb. 1). Es mußte daher überraschen, daß bei einigen solcher Gallen eine dichte Behaarung sich einstellte. Die ganze Oberfläche der Geschwulst oder doch wenigstens ein Teil derselben war von einem Haarfilz bedeckt und durch reines Weiß sehr auffallend (Abb. 2).

Die Haare sind so groß, daß sie mit freiem Auge leicht zu sehen sind. Es handelt sich dabei um Drüsenhaare mit vielzelligem Stiel und kleinen Köpfchen. Die an die Wucherung angrenzenden Stengelpartien, die von der krebsigen Geschwulst nicht ergriffen sind, besitzen nur relativ wenig Haare. Schon das makroskopische Aussehen ließ vermuten, daß die Crown-Gall-Haare besonders groß sein müssen. Mikroskopische Mes-

sungen ergaben eine Länge von 1,8 bis 3,0 mm, einzelne Haare erreichten sogar eine Länge von 3,8 mm. Die Haare an den vom Krebs nicht befallenen Stengelteilen hatten eine Länge von 0,7 bis 1,0 mm, nur in ganz seltenen Fällen wurden sie etwas länger. Der Querdurchmesser der basalen Zellen der Gallenhaare erreichte ungefähr die doppelte Dimension wie der der normalen Haare.

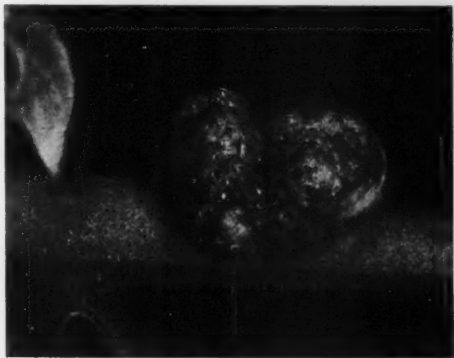


Abb. 1. Crown-Gall mit glatter Oberfläche.

Reichliche Behaarung wird durch verschiedene Gallenerzeuger, vor allem Milben, und unter den Mykozevidien von *Synchytrium* veranlaßt, über „Filzgallen“, die durch Bakterien hervorgerufen werden, finden sich bei Küster (1911, 1925) keine Angaben.

Die Zellkerne normaler Haare sind — insofern sie in der Mitte der Zelle liegen — nur an einzelnen, dünnen Cytoplasmafäden aufgehängt. Die Nuclei der Riesenhaare der Crown-Galls umgibt dagegen ein ganzer Kranz von Plasmasträngen; diese strahlen radiär von der Cytoplasmahülle des Zellkerns aus und bilden rings um ihn einen wabig strukturierten Mantel (Abb. 3). Dieses Bild entspricht ganz der amphinuclealen Cytoplasmastruk-

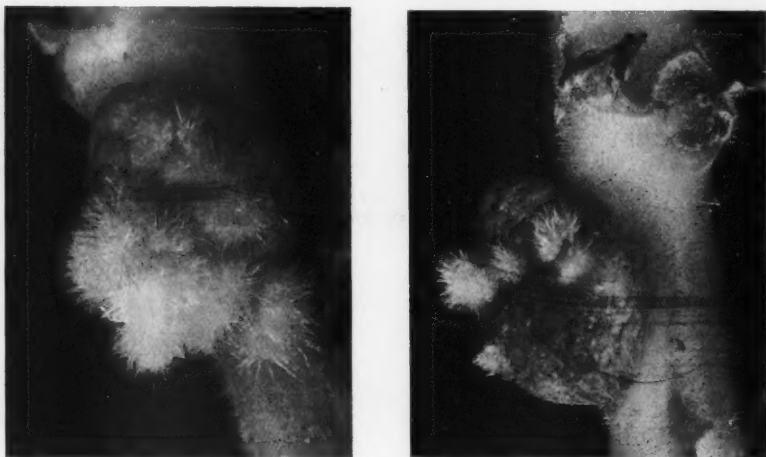


Abb. 2. Behaarte Crown-Galls auf *Nicotiana*.

tur, die Zech und Vogt-Köhne (1956) für Haarzellen von *Nicotiana* beschrieben haben, die sich im zweiten Krankheitsstadium nach einer Infektion mit dem Tabakmosaikvirus befinden.

Der pathomorphologische Zustand der Zelle bei dieser Virose ist nach Zech und Vogt-Köhne gekennzeichnet durch „Kernhypertrophie und typische strahlenförmige Anordnung der cytoplasmatischen Stränge“ rings um den Zellkern. Auch den Haaren der Tumoren fehlt das Symptom der Kernvergrößerung nicht (Abb. 3). Ob diese „Hypertrophie“ etwa die Folge einer endomitotischen Polyploidisierung ist, läßt sich nicht ohne weiteres sagen, an die Möglichkeit ist aber jedenfalls zu denken, da in Tumorzellen polyploide Kerne vorkommen können (Lit. bei Geitler 1953, 57).

Beachtenswert ist es wohl, daß der Protoplast der Zellen der Tabakdrüsenhaare auf Infektion mit dem Mosaikvirus und mit dem Tumorbazillus in mancher Hinsicht in gleicher Weise reagiert. Darin etwa eine Stütze der Annahme zu sehen, das Crown-Gall-Bakterium sei ein Virus-

überträger, wäre wohl kaum zulässig. Auf die Hypothesen, die über die Umwandlung normaler Pflanzenzellen in Krebszellen aufgestellt worden sind, wird hier nicht eingegangen; die Literatur darüber haben u. a. Ropp 1951 und Braun 1954 zusammengestellt.

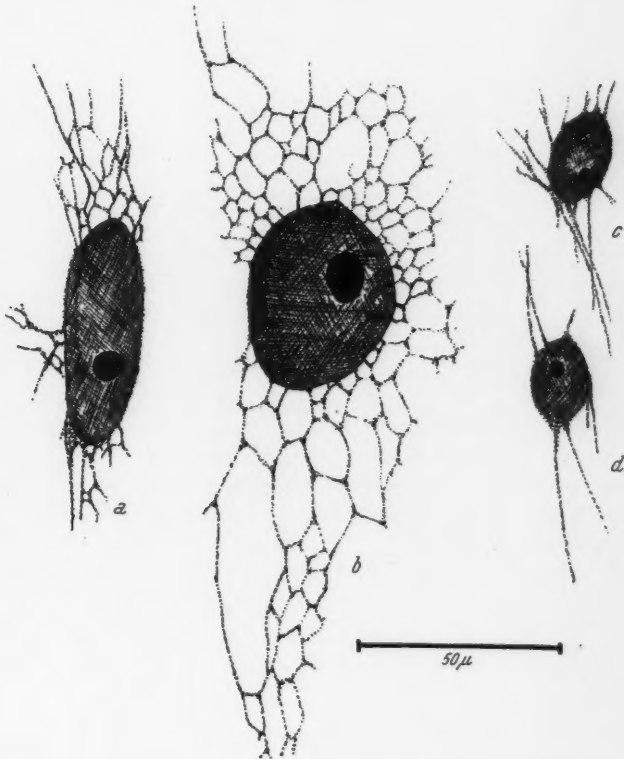


Abb. 3. Zellkerne von *Nicotiana*-Drüsenhaaren. *c, d* normale Kerne, *a, b* „hypertrophierte“ Kerne in einer wabig strukturierten Cytoplasmatasche.

### Zusammenfassung

Bei einigen Exemplaren von *Nicotiana Tabacum* trat an jungen Crown-Gall-Tumoren eine ungewöhnlich dichte Behaarung auf. Die Drüsenhaare solcher „Filzgallen“ erreichten in der Längs- und Querdimension ungefähr die doppelten Werte der normalen Trichome. Die Zellkerne der Riesenhaare waren auffallend groß, ebenso die Nucleolen. Die Cytoplasmatasche, in der die „hypertrophierten“ Kerne lagen, zeigte strahlenförmig angeordnete Stränge und wabige Struktur, wie sie für virusinfizierte Tabakhaare beschrieben worden sind.

## Literatur

- Braun, 1954: The Physiology of Plant Tumors. Ann. Rev. Plant Physiol. 5.  
Geitler, 1953: Endomitose und endomitotische Polyploidisierung. Protoplasmatologia VI C.  
Küster, 1911: Die Gallen der Pflanzen. Leipzig.  
— 1925: Pathologische Pflanzenanatomie. 3. Aufl. Jena.  
Ropp, 1951: The Crown-Gall Problem. Bot. Rev. 17.  
Zech und Vogt-Köhne, 1956: Untersuchungen zur Reproduktion des Tabakmosaikvirus. Exper. Cell Res. 10.

# Seasonal Changes in Some Chemical and Physical Properties of Living Cells of *Pinus ponderosa* and their Relation to Freezing Resistance<sup>1</sup>

By

**Johnson Parker**

Southern Forest Experiment Station, U. S. Forest Service, U. S. D. A.,  
Marianna, Florida

With 3 Textfigures

(Received June 8, 1956)

The causes of seasonal fluctuations in cold hardiness of plants have long been sought in chemical and physical changes within the cells, but in spite of many extensive studies there is still no clear explanation of what factors produce the condition of hardiness in such plants as the woody evergreens. The concensus of opinion is that changes in carbohydrates and ions which tend to be reflected in osmotic pressure variations do not show a very good relation to changes in resistance to freezing. This is brought out in a number of publications specifically concerned with conifers which will be discussed later in this paper. Although most of our findings support this concept it became obvious during the course of the work that certain physical changes that could be observed under the microscope were better related to the main changes in hardiness than the overall carbohydrate changes. However, one sugar, separated by the new chromatographic technique, did show some remarkable seasonal changes. It therefore seems worthwhile to report on the physical changes that have been observed to accompany fluctuations of hardiness as well as the results of the chromatographic separations. As far as we know chromatography has not been employed in such seasonal studies and only a few chromatographic data are available for conifers (Bidwell *et al.* 1952, Kano and Hatano 1953).

<sup>1</sup> Conducted at the Univ. of Idaho, Moscow. Thanks are extended to Duane LeTourneau and E. K. Raunio for helpful suggestions, to W. K. Ferrell for loan of apparatus, and to Martha Sue Dempsey for help in the chromatographic work. We are further indebted to P. J. Kramer, Duke Univ., Durham, for suggestions on the manuscript.

### Method

1. *Sampling and Freezing Procedure*:—Twigs were sampled randomly from a group of *Pinus ponderosa* Dougl. trees 15 years old and 3 meters tall growing in the same forest location described previously (Parker 1955 b). After being brought into the laboratory, a trip of about half an hour, 4 stem sections 3 cm. long were cut from the one year old part of each twig and cooled and warmed in the low temperature apparatus as previously described (Parker 1955 b). Leaves were cut from similar twigs, divided into 4 groups of 3 fascicles each and placed in test tubes, one group to a test tube, for the same cooling procedure. Only the youngest leaves were used until June when the new leaves began to appear. At this time only the one year old leaves were sampled. Freezing tests were carried out for leaves about every 2 weeks; roots about once a month. Roots were dug from the same area mentioned above and 2 year old suberized roots about 4 mm. in diameter were cut into 10 cm. lengths. These were kept in stoppered jars of moist soil until brought in the laboratory, cut into 2 cm. lengths, and placed in the freezing apparatus at a starting temperature as close as possible to that of the environment from which they came.

Viability was determined in leaves by a combination of the following criteria: reduction of the oxidation-reduction indicator 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (Paul Lewis Labs., Milwaukee) as previously described (Parker 1951, 1952, 1953, 1955 a), discoloration of leaves from grass green to dull green (Parker 1955 b), and rapid leaf dehydration. Only when all three of these happened together were the leaves considered dead. Viability of twigs and roots was determined in the following way: after an 18 hour infiltration period with 0.5% aqueous unbuffered solutions of tetrazolium, sections were cut longitudinally and examined microscopically. Reduction in rays and vertical parenchyma was mainly relied on as a test for viability.

2. *Microscopic Studies*:—Concomitantly with the freezing studies, tests on uninjured cells of twigs, trunks, leaves, and roots with various stains or reactants were made:  $I_2KI$  (procedure of Meyer and Anderson 1948), Sudan Black B (Aniline Dye Corp.) in ethanol at 1:1000, Millon's reagent (procedure of Meyer and Anderson 1948) and tetrazolium chloride at 0.5% aqueous unbuffered. All solutions except the tetrazolium were directly applied to the transverse and longitudinal sections of the various parts of the tree, observed after one minute, and then for five minutes more. The tetrazolium salt was allowed to infiltrate pieces of stems, leaves, trunks, or roots for 18 hours before they were sectioned. All sections were examined at magnifications of 35 to 430 power, using an incandescent light source with "daylight" blue filter.

3. *Extraction Methods and Chromatography*:—Chemical analyses at various times of the year were carried out as follows. One year old leaves were cut from the twigs which had been brought from the same source mentioned above and 15 g. of leaves were weighed without washing or other treatment. Samples of bark were obtained from branches about 10 years

old growing on trees about 60 years old. First the outer scaly bark was removed and discarded, then strips of inner bark one cm. wide were cut off with a knife. Both leaves and strips of bark were cut into pieces one half cm. long and treated by one of two extraction methods.

Method 1 was a Soxhlet extraction using 250 ml. of 80% ethanol and refluxing through a Whatman fat-extracted thimble of 150 ml. capacity for 7 hours; the apparatus siphoned once every half hour. Then the heat was shut off and the apparatus allowed to stand cold for 18 hours. At the end of this time all extract was drained off. This is somewhat similar to the method of Woodward and Rabideau (1953) for free amino acid extraction from corn shoots. The homogenization method of Steward *et al.* (1951) gave substantially similar results so that it seemed that the heating effect in Soxhlet extraction did not cause serious hydrolysis. By means of taking successive 2 hour samples from the Soxhlet apparatus it was found that about 80% of the sugars were extracted at the end of 7 hours of continual refluxing. In a certain length of time the amount of amino acids extracted is about the same as the amount of sugar although this varies for individual amino acids. In the same time somewhat less of the organic acids are removed (Woodward and Rabideau 1953).

Method 2 was carried out with the aim of preventing acid hydrolysis during extraction, although the addition of a strong base apparently had effects of its own as will be seen in the results. This was similar to Method 1 except that leaves or bark were kept in the lower part of the apparatus, no filter or thimble was used above, and 10 g. of  $\text{KHCO}_3$  were added to the 80% ethanol. All extracts were evaporated to 15 ml. at  $45^\circ\text{C}$ . (unless otherwise stated) by means of a jet of air.

Chromatography was carried out with Whatman no. 1 filter paper  $46 \times 57$  cm., either by the ascending or descending method in a "Chromatocab" (Research Equipment Corp., Oakland, California). The most satisfactory procedure for sugars was the descending method with N-butanol- $\text{H}_2\text{O}$ - $\text{HCOOH}$  (4-5-1 v : v) solvent and *p*-anisidine  $\text{H}_3\text{PO}_4$  spray (Mukherjee and Srivastava in Linskens 1955).  $\text{AgNO}_3$ - $\text{NH}_4\text{OH}$  and also tetrazolium chloride sprays were used to identify reducing sugars and distinguish between polyhydric alcohols and reducing sugars as described in Linskens.

Organic acids were separated by the descending method mentioned above with various sprays and by the ascending method using phenol- $\text{H}_2\text{O}$  (3-1 v : v plus 1%  $\text{HCOOH}$ ) and various sprays. Only aliphatic acids were originally tested for but it was suspected that aromatic acids might be involved, therefore some tests with butanol-pyridine- $\text{NaCl}$  solution (1-1-2 v : v) were used (Linskens 1955, p. 220-224).

Tests were made for the total amounts of amino acids by the ascending one and two-dimensional methods described by Underwood and Rockland (1954 a, b) although we used the large filter papers mentioned above.

Determination of polyhydric alcohols was attempted since various writers believed these compounds to be either commonly present in conifers (Stein-

ner 1933, Plouvier 1952, 1953) or capable of influencing cold resistance (Luyet and Gehenio 1952). The method of Harvey and Higby (1951) for determining glycerol in liver extracts was attempted but then abandoned since glucose was found to interfere with the procedure in spite of the included steps to remove it. The chromatographic method was therefore used (Block *et al.* 1955).

### Experimental

1. *Freezing Tests*:—The freezing resistance of twigs, roots, and leaves is shown graphically together with the daily temperature maxima and minima in Fig. 1. The early November conditions produced a hardiness greater than  $-47^{\circ}\text{C}$ . in leaves and twigs whereas previously the leaves

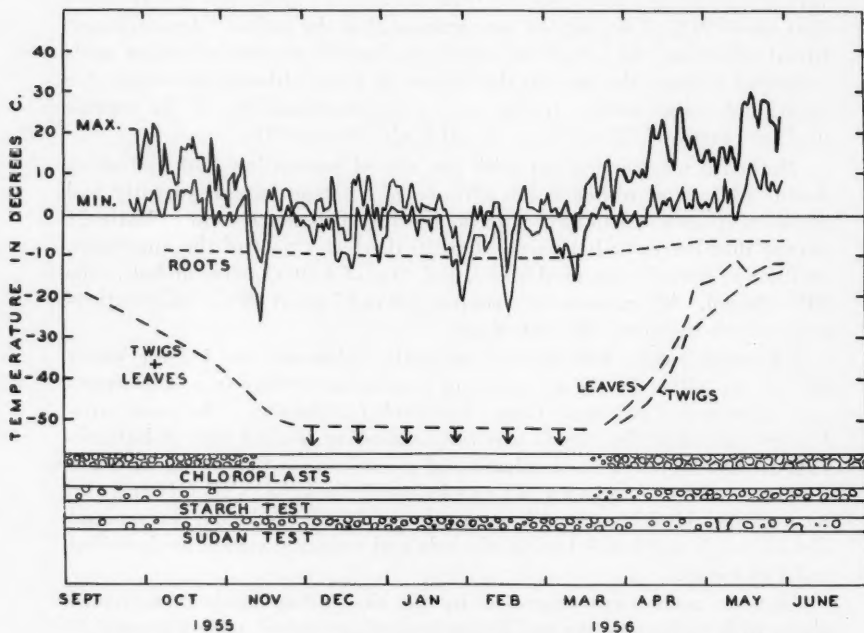


Fig. 1. Upper curves, maximum and minimum temperatures plotted daily over time. The first of each month is at the mark to the left of the month's name. Twig and leaf data are combined in lower dashed line until spring when they separate as shown. Dashed lines indicate lowest possible temperature that more than 50% of the leaf, twig, or root sample could withstand, except in cases where arrows are shown. Arrows indicate killing temperature is below this point. "Roots" refers to the resistance to low temperature of roots dug from a 20 cm. depth. "Chloroplasts" shows the trend in chloroplast appearance in leaves at time shown. "Sudan" refers to the presence of Sudan Black B-staining bodies, and "Starch" to presence of starch grains in twig cortex. All data for *Pinus ponderosa*.

and twigs had been hardy to about  $-30$ . The onset of this cold period was quite sudden and caused severe damage to apple and other fruit trees in the northwestern United States. In spring, *Thuja orientalis* trees planted around Moscow showed browning of the younger leaves, although this may have been a result of winter drying. No other damage to conifers was observed.

In spite of a warm period in January the hardiness of *P. ponderosa* leaves or twigs did not come above the lowest temperature obtainable in the apparatus ( $-47$ ). Roots in the meantime varied only slightly in hardiness as shown in Fig. 1. From December into spring the first sign of damage to leaves cooled to  $-47$  occurred on March 31st about 2 weeks after the beginning of the warm period of late March. Thereafter the hardiness decreased rapidly as shown in Fig. 1, apparently because of the clear warm weather of April.

2. *Microscopic Studies*:—The principal results for the various tissues of twigs, leaves, roots, and trunks are shown in Table 1. Of these various observations the following are of interest to the hardiness changes.

a) The starch change had already largely taken place in the twigs by the end of October before the main hardiness changes occurred (Fig. 1). By December, Sudan Black-staining bodies entirely replaced the starch as shown in Table 1. It is of importance to notice that the roots underwent the same changes, although somewhat later in the winter, and yet the hardiness only increased about  $2^{\circ}\text{C}$ . In spring, hardiness decreased about  $4^{\circ}$  as the starch reformed in roots.

b) The reversion to starch in twigs and leaves in spring was quite rapid as compared to its disappearance in autumn. Even the roots showed a rather quick conversion to starch in spring (Table 1).

c) The changes in the cellular condition of the leaves was closely related to the main changes in hardiness (Fig. 1). Chloroplasts disappeared in autumn after the first hard cold spell and simultaneously the hardiness increased to a level greater than (below)  $-47$ . In spring the reversion to normal chloroplasts also was closely related to the change in hardiness (Fig. 1). This reversion also occurred in *Pseudotsuga taxifolia* and *Abies grandis* in the same location within about a week of this time. Other changes within the leaves are noted in Table 1. Chloroplast appearance is illustrated in Fig. 2.

Endodermis cells also changed in appearance in November, becoming more opaque and even yellowish. In spring their appearance was different from either the autumn or winter condition since starch grains formed in abundance but in between the grains the protoplasm appeared more transparent than in winter. Later these cells became so filled with starch that the transparency was hard to judge. Although molecular action was looked for all winter in the chlorenchyma, it could not be observed until late March and then it was seen only in a few localized places in some cells. In April and May we again could not see molecular action in those cells.

d) The cells of *Pinus monticola* leaves obtained January and February from a heated greenhouse were compared to similar cells of the same species from the forest. These experiments showed the greenhouse leaves to be practically in the late summer condition with normal chloroplasts (Fig. 2), rather transparent endodermis cells showing some molecular action, and a freezing resistance of  $-24^{\circ}\text{C}$ . The forest leaves of this species had the same general condition as the *P. ponderosa* leaves mentioned above and were resistant to at least  $-47^{\circ}\text{C}$ . in January and February.

Table 1. Relative amount of staining, accumulation, or reactive effect after 1-5 min. of  $\text{I}_2\text{KI}$  (I), Sudan Black B (S), and Millon's reagent (M) in various tissues of *Pinus ponderosa* at the times shown.

"3" indicates strong, "2" medium, "1" weak, and "0" no test. Blanks indicate test uncertain or not made. \* chloroplasts reforming, \*\* chloroplasts reformed.

		Sept. 23	Dec. 10	Jan.-Feb.	Mar. 19	Mar. 31	Apr. 20	May 15
	Tissue	I S M	I S M	I S M	I S M	I S M	I S M	I S M
Stem	xylem rays . .	1 2 1	0 3	0 3	0 2	2 1	2 1	1 1
	phloem rays .	2 2 1	0 3	0 3	0 2	2 1	3 1	2 0
	vertical parenchyma	2 2 3	0 3 3	0 3 3	3	1 1 2	3 2 2	3 0 1
	cortex . . . .	2 2 1	0 3	0 3 1	1 1 1	1 1	3 1	3 1
Leaf	chlorenchyma .	2	0 1 3	0 3 3	*	0**	3	3 1 3
	endodermis . .	2	0	0		2	2	3 1 0
Root	wood rays . .	1 3		0 3	0 1	0	3 1	3 1
	phloem rays .	1 3		0 2	2	0	3 1	3 1
	periderm . . .			0 2	1 0 1	1		3 1
	vertical parenchyma			0 2	0 1	0	3 1	3 1
Trunk	inner xylem rays . . . . .			0 3		0 3	0 2	0 2
	outer xylem rays . . . . .			0 3		0 3	2 1	1 1
	phloem rays .			0 3		1 3	2 1	1

e) Millon's test was especially striking in the vertical phloem parenchyma of the twigs all through the autumn and winter, the black appearance occurring only a few seconds after the reagent was added to the sections. In the spring, however, even in late March, the test began to show signs of being weaker and became still weaker in April giving a yellowish-brown test rather than black in these stem cells (Table 1). The leaf chlorenchyma cells also showed this test very strongly but seasonal changes were not detected, and few observations were made. This is apparently a test for phenols when no heat is applied (Mitchell 1950, p. 126).



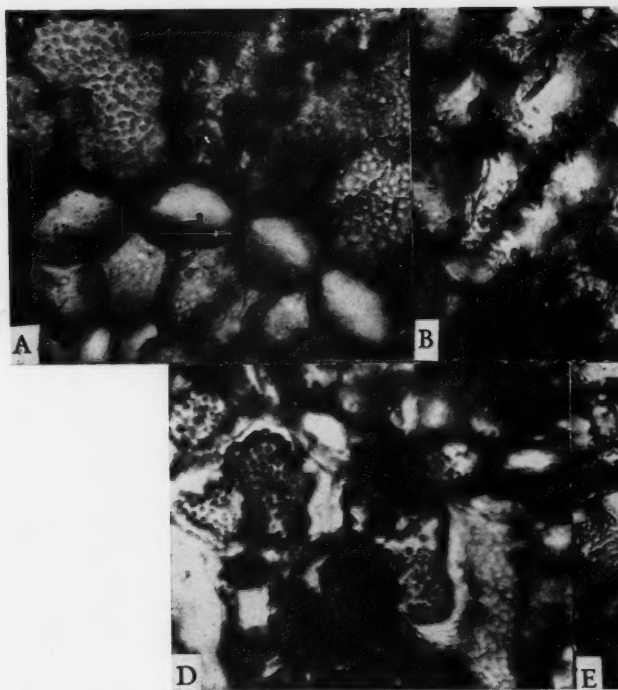


Fig. 2. *A*, *B*, and *C*: sections of *Pinus ponderosa* leaves,  $\times 310$ . *A*: present; Sept. 17. *B*: chlorenchyma cells in winter condition; chloroplasts reforming; March 31. *D* and *E*: *P. monticola*. *D*: from green upper endodermal cell to l



FIG. 10. *A*: chlorenchyma, endodermis, and transfusion tissue; chloroplasts intact; chloroplasts disintegrated; Jan. 20. *C*: chlorenchyma with chloroplasts; Jan. 20. *E*: from forest; Jan. 22. Note opacity in *E* of left of transfusion tracheids.

f) The tetrazolium test on uninjured tissues showed reduction in all cells that contained cytoplasm. This appears to include the younger (un-crushed) sieve cells, although a 30 hour infiltration period was necessary to give results. Although some workers stress the importance of concentration of this salt in staining for mitochondria, etc., the length of time the tissue remains in the solution also is of great importance. Reduction of this salt was also observed in the resin of ducts; reducing agents such as pyrogallol might account for this, but it is of interest that low temperatures may destroy the means of reduction of tetrazolium chloride in resin.

Table 2. Amounts of various sugars in leaves and inner bark of species shown, expressed as percentage of fresh weight after 18 hours extraction. This constitutes about 90% of total. All ponderosa pine samples are from the forest. All zeros in table indicate quantity is less than 0.1%.

Rf.	Sugar	February Condition								May Condition							
		Acid Extraction				Base Extraction				Acid Extract.				Base Extract.			
		<i>P. ponderosa</i>		<i>P. monticola</i>		<i>P. ponderosa</i>		<i>P. monticola</i>		<i>P. ponderosa</i>		<i>P. monticola</i> leaves, forest	<i>P. ponderosa</i>	<i>P. ponderosa</i>		<i>P. monticola</i> leaves, forest	
		leaves	bark	greenhouse leaves	forest leaves	leaves	bark	greenhouse leaves	forest leaves	leaves	bark			leaves	bark		
0.23	Fructose . .	0.5	0.4	0.5	0.5	0	0	0	0	0.8	0.5	0.4	0	0	0	0	
0.18	Glucose . .	0.8	0.8	1.0	0.8	0.5	0.5	0	0.5	0.8	0.3	0.3	0	0	0	0	
0.14	Sucrose . .	1.0	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.6	0.5	0.5	0.3	0	0.3		
0.05	Raffinose .	1.0	0.2	0	1.0	1.0	1.0	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0	

3. *Chromatography*:—a) Results for sugars from *P. ponderosa* leaves are shown in a typical chromatogram in Fig. 3. Fructose, glucose, sucrose, and raffinose<sup>2</sup> appeared consistently in the leaves and bark from early December to early April in "Method 1" (acid) extracts (Table 2). "Method 2" (basic) extracts did not show fructose and there was much less glucose in winter than in the acid extracts (Table 2). In May the very low levels of sugars in basic extracts is even more pronounced. In spring, raffinose in acid extracts greatly decreased, the first noticeable decrease on our papers being in early April, then decreasing into May until it was undetectable or below a level of 0.1%. Leaves of *P. monticola* taken from the heated greenhouse in January and February lacked raffinose (or was less than 0.1%) but the same species' leaves from the forest showed that it was present (Table 2).

Sugars not detected from Method 1 or 2 extracts at the usual level

<sup>2</sup> Bonner (1950) mentioned melezitose in conifers, but the Rf of this trisaccharide is about 0.08 as compared to 0.05 for raffinose.

(2.5  $\mu$ l. from 15 ml. of extract from 15 g. of fresh leaves) included galactose, mannose, arabinose, maltose, cellobiose, lactose, xylose, and ribose.

Seasonal variations in total reducing sugars from Method 1 extracts determined with  $\text{AgNO}_3\text{-NH}_3$  spray were hardly discernable from October to June. However, the *p*-anisidine spray showed a tendency for fructose

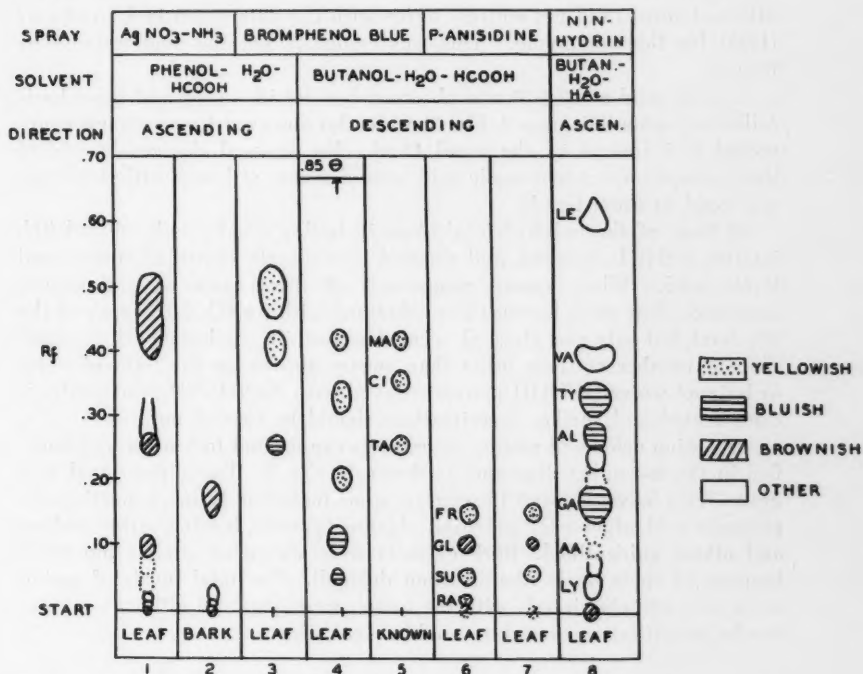


Fig. 3. Typical chromatograms for acids, sugars, and amino acids and amides. All extracts made in January except no. 7 which was made in late April. Spots redrawn from original papers. *MA* malic acid, *CI* citric acid, *TA* tartaric acid, *FR* fructose, *GL* glucose, *SU* sucrose, *RA* raffinose, *LE* leucine, *VA* valine, *TY* tyrosine, *AL* alanine, *GA* glutamic acid, *AA* aspartic acid, *LY* lysine.

to increase in spring while glucose declined slightly in some, sucrose a little more, and raffinose the most.

b) Organic acids were considerably more difficult to identify but it seems worthwhile to report the results since this forms a basis for future work. Some typical Method 1 leaf chromatograms are shown in Fig. 3. The top spot ( $R_f$  0.43 in diagram 4, Fig. 3) appeared to be malic acid and declined somewhat in April. The next acid spot down at  $R_f$  0.32 was first thought to be citric acid, but although citric acid may contribute to it, the spot seems to represent at least one other acid. E. K. Raunio, Dept. of

Physical Sciences, managed to isolate an acid at this  $R_f$  which he suggested from various tests might be an aromatic hydroxy acid. Ascorbic acid also gave a spot at this same  $R_f$  and a level of 2 mg. ascorbic acid/g. fresh leaves was found by titration of the leaf homogenate. Papers developed in butanol-pyridine-NaCl solvent showed a number of spots, one at  $R_f$  0.74 that might be protocatechuic acid, a resin degradation product, but all the different sprays did not entirely agree with the data given in Linskens (1955) for this compound. This was evidently not the acid isolated by Raunio.

A third acid at  $R_f$  0.20 was observed but not identified and three basic (alkaline) spots (Diagram 4, Fig. 3) were also observed from extracts evaporated to 5 instead of the usual 15 ml. No seasonal changes in any of these compounds except malic acid were detected although little attention was paid to these trends.

c) None of the polyhydric alcohols including ethylene glycol, dulcitol, inositol, sorbitol, mannitol, and glycerol were clearly identified at the usual levels used. When known compounds of this group were chromatographed, clear spots for each were obtained with  $AgNO_3-NH_3$  spray at the 12% level, but only one, glycerol, seemed a possibility in basic bark extracts. Since a number of spots other than sugars appear on the butanol-water or butanol-water- $HCOOH$  papers sprayed with  $AgNO_3-NH_3$ , the matter is complicated and further investigations should be carried out.

d) Amino acids and amides in extracts evaporated to 3 ml. were identified in the ascending diagrams as shown in Fig. 3. Two-dimensional diagrams from leaves showed 15 separate spots including lysine, aspartic acid, glutamic acid, glycine (?), arginine, alanine, tyrosine, leucine, serine, valine, and others unidentified. Bark extracts were somewhat similar but overlapping of spots made identification difficult. For total levels of amino acids no particular trends with the season were observed although a more careful quantitative procedure might reveal some.

### Discussion

So much has been written on the subject of the causes of freezing resistance in plants that it seems important to discuss some of the more pertinent papers in relation to the work described above.

A great many workers have reported starch disappearance in conifers in autumn (Mer, 1876, Schulz 1888, Lidforss 1896, Lewis and Tuttle 1923, Guttentberg 1927). On the other hand Miyaké (1902), Fabricius (1906), and Kirchhoff (1915) found that some starch remained in some of the above ground parts of some conifers. It may be, however, that Miyaké's results at least, can be explained by the mild climate in which he worked (Tokyo). Pisek (1950) found starch remained in conifer leaves near Innsbruck into December but then disappeared, returning in spring. In any case, the disappearance of the starch in itself does not seem to impart an increase in hardness more than about 2-4°C. as judged from our work with roots. In connection with this, Simino-

vitch and Briggs (1954) thought that the disappearance of starch did enhance the hardness of *Robinia* bark although this effect was only slight.

Another question in connection with this that came up many years ago was the one concerning the fate of the starch after its disappearance. A. Meyer (1918) concluded from a number of tests that it was a mistake to assume that the starch was converted to fat as many had formerly supposed. Kirchhoff (1915) thought that starch was replaced by tannins. Certainly tannins seem to be of importance in bark of many conifers if we are to judge by the work of Kurth and Hubbard (1951) who reported that 5.6–11.4% of *Pinus ponderosa* bark extract was tannin and by work of Gerngross and Gülbayan (1952) who found as much as 20% in bark of certain European pines. However, the chemistry of tannins is very vague. To quote from Paech (1950, p. 156): "Gerbstoffe stellen chemisch keine einheitliche Gruppe von Verbindungen dar. Physiologisch sind sie bisher meist ohne Rücksicht auf ihre chemische Konstitution betrachtet worden."

The fact that raffinose appears in winter or before winter (we have no autumn observations on this) and disappears as starch reforms, offers another possibility for the fate of the starch besides the production of Sudan Black-staining bodies. Since Sudan Black accumulates in resin of resin ducts, it may seem a little doubtful that this is exclusively a fat "stain" for liquid compounds. Cain (1950) thought that it was an indicator for lipid in animal cells as long as the particles were liquid. It is, of course, possible that unsaturated fatty acids and related compounds are present in resin.

Whatever may happen to the starch, the fluctuations of sugars in winter seem so irregular that overall trends are hard to follow. Worley (1937) worked with *P. ponderosa* just as did Clements (1938) and yet she found rather different results from Clements for seasonal fluctuations of total and reducing sugars. Perhaps this is due to different weather conditions in different years in the Moscow-Pullman area. Clements presented graphs that show so much variation among leaves of different ages that one wonders if the seasonal fluctuations are really significant. Our own data for total reducing sugar levels from September to May showed so little variation that at first we were inclined to the conclusion of Pisek (1950), i.e., that sugars play only a secondary role at best in hardness changes in these conifers. This generally agrees with the conclusions of Meyer (1928), Levitt (1941), and Siminovitch and Briggs (1949) for various plants. However, the radical spring change in raffinose noted in our work presents a new perspective that should be investigated further. It appears that this sugar did not start to decrease in spring until somewhat after the earliest hardness changes and therefore seems better related to later changes occurring in hardness in late April and early May. Of course, the quantitative method used here may not be sensitive enough to detect the early changes.

It may also be that the summer changes in hardness are largely related to raffinose changes or even to total sugar changes. The steady increase in

osmotic pressure recorded by Gail (1926) for *P. ponderosa* and related conifers from June to November seems to be related to carbohydrate increases as suggested by data of Meyer (1928) and of Goldsmith and Smith (1926) for other conifers. Kurimoto *et al.* (1954) and Pisek (1950) suggested that certain salts may also contribute to the osmotic pressure, but in most conifers this seems to be only small. The increase in carbohydrates, in turn, may account for the pre-winter increases in hardness noted by Winkler (1913) and Parker (1955b) and suggested by Siminovitch and Briggs (1949) in *Robinia* although the last-mentioned workers thought that the main hardness changes were best related to changes in amount of water-soluble protein.

This brings us to the main changes in hardness that occur in autumn, and in conifers it seems to be related to the transformation of the living leaf cells into an entirely different physical condition in the climate of northern Idaho. This condition includes the disappearance of the chloroplasts and an apparently greater opacity of such cells as those of the endodermis.

A number of other workers have observed this chloroplast disappearance in their seasonal studies of conifers. The first was evidently von Mohl (cited by Pfeffer according to Lewis and Tuttle 1920), then Lewis and Tuttle (1920), Zacharowa (1929), and Schmidt (1936). Kessler and Ruhland (1938) also mentioned chloroplast changes in their evergreens. Lewis and Tuttle (1923) thought that the starch disappeared in autumn in *Picea canadensis* leaves at the same time that the chloroplasts did, but our results showed that the starch had already largely disappeared by this time. Zacharowa's results in Moscow, Russia, closely resemble our own for chloroplast behavior, but, as in Lewis and Tuttle's work, this was not related to hardness changes. Schmidt attempted such relations, but his freezing studies showed no clear ones except that the "starke Trübung" of the chlorenchyma cells in October was related to the first hard frost. In Schmidt's Schwarzwald spruces the chloroplasts remained largely in an intact state until January 1st and then disappeared during January and February.

These physical changes noted above may be related to the changes observed by Kessler and Ruhland (1938) in a number of evergreen species' leaves. They believed that the physical changes in the cells including viscosity increases did show a relationship to the freezing resistance. This seems to be in contrast to the results of Levitt and Siminovitch (1940, 1941). Although Scarth and Levitt (1937) thought that the cells of *Catalpa* twig cortex showed no molecular motion and no streaming in winter, Levitt and Siminovitch (1940) later concluded that results depended on the areas of the cell contents examined and that the winter hardy cells did show streaming and molecular motion. Perhaps some of the lack of agreement over the physical condition of the protoplasm is to be explained by the difference in species, something that should not be lost from view in considering the causes of protoplasmic resistance to

stresses brought about by dehydration (Höfler 1954). Also discrepancies might be due to the different climates in which the various workers have experimented or to the fact that the cells have not been thoroughly hardened in some cases. Evidently the viscosity of the protoplasm is quite variable in a single cell and can be reversibly changed by temperature treatment (Weber and Hohenegger 1923) or by application of an electric current (Bersa and Weber 1922).

Currier *et al.* (1955) suggested that the protoplasm in sieve tube elements of *Vitis* does change in winter. In the dormant condition the contents of these cells were more opaque (compare to Schmidt 1936), molecular motion mainly decreased or stopped, protoplasts "thicker" in outline when plasmolyzed, plasmolysis shape different (compare to Kessler and Ruhland 1938), and "surge" of contents more sluggish. This would seem to point to an increased gelation of some of the cell contents in winter.

The idea of gel formation has been forwarded a number of times in the past, as for instance, Newton (1924) with wheat, Meyer (1928) with *Pinus rigida*, Priestley (1930) with various British trees, and Clements (1938) with *P. ponderosa*. Meyer's data showed rather sharp changes in total expressable liquid from leaves in autumn and in spring, but Meyer (1932) later concluded that the apparent increase in expressable water in summer was due to higher total water content and that "bound water" was not a factor influencing cold resistance in this species. He suggested that an increase in colloids might have other stabilizing effects on the protoplasm. However, here we may be largely concerned with vacuolar changes and certainly Lewis and Tuttle (1920) in conifer leaf cells and Bailey (1954, p. 37) in conifer cambial cells noted some marked changes in the vacuoles with the coming of colder weather.

These vacuolar and protoplasmic changes probably explain why osmotic pressure changes in winter are often so poorly related to hardness variations. Doyle and Clinch (1926) thought that the low osmotic pressure results of Korstian (1924) with conifer leaves in winter were the result of getting much less total expressable material from the leaves. Meyer (1928) also suggested such a possibility and Larcher (1954) recently discussed this problem, pointing out especially the discrepancies between osmotic pressure and hardness changes. Weber (1935) reviewing Kessler's work summed it up as follows:

"Die vielfach vertretene Ansicht, die Unterschiede in Kälteresistenz der Pflanzen könnten in Eigenschaften des Zellsaftes (osmotischer Wert, pH) begründet sein, wird auf Grund von Versuchen an *Saxifraga cordifolia*, *Hedera Helix* und *Sempervivum glaucum* abgelehnt."

In the end it appears that the biochemical studies, greatly aided by the new chromatographic methods, should be made in conjunction with microscopic studies, the latter greatly aided by the new optical methods and vital staining procedures so that these two sciences will work together to solve this difficult problem.

### Summary of Main Results

Freezing resistance studies of leaves, stems, and roots of *Pinus ponderosa* were made concurrently with microscopic and chromatographic observations for nearly a year. The principal results were as follows.

1. After a rather slow increase in hardiness in September and October a somewhat faster increase in hardiness to temperatures down to at least  $-47^{\circ}\text{C}$ . occurred in leaves and twigs after the first substantially sub-freezing weather of the year. This latter change was associated with a loss of chloroplasts in the leaf chlorenchyma and an increase in opacity and apparent decrease of fluidity of endodermis cells. A marked decrease in hardiness in spring was likewise closely associated with the chloroplast reappearance and changes within the endodermal cells.

2. Starch generally decreased during the summer and Sudan Black B-staining bodies increased in stems and trunks, reaching a point in December when all starch was gone and Sudan-staining bodies were common. This also occurred in the 2 year old roots, but at a later time and was not associated in roots with any marked increases in hardiness more than  $2-4^{\circ}\text{C}$ . Roots were never resistant to temperatures lower than  $-10^{\circ}\text{C}$ . In spring (late March and early April) starch reappeared in stems and leaves and almost at the same time in roots.

3. Phenolic compounds (supposedly indicated by darkening of Millon's reagent) in the vertical phloem parenchyma of twigs showed a diminution in early spring (late March) and this only slightly preceded the reappearance of starch.

4. Tetrazolium chloride reduction showed little or no seasonal trend and was reduced to formazan by rays and by contents of resin ducts both in the center (diameter-wise) of large trees and in outer wood and inner bark. Sieve cells showed a slight reduction of this salt at 0.5% in 30 hours.

5. Chromatograms of sugars from leaves or bark showed fructose, glucose, sucrose, and raffinose, but no other free sugars in winter at the levels used. Raffinose showed a marked decline in April in leaves and was not detectable in early May. No separations of all four sugars were made in autumn. Basic leaf extracts in winter showed much less glucose and no fructose and sometimes less of the other two sugars than did acid extracts, suggesting alkaline hydrolysis.

6. Chromatograms of acids showed three acid spots and three basic ones. Malic acid was indicated by its position, but citric and tartaric knowns did not exactly correspond to the unknowns. One acid was isolated; this may be an hydroxy aromatic acid.

7. Chromatograms of polyhydric alcohols from leaves and bark indicated no definite ones at the levels used.

8. Chromatograms of free amino acids and amides showed lysine, aspartic acid, glutamic acid, glycine (?), arginine, alanine, tyrosine, leucine, serine, and valine as well as others unidentified. No seasonal trends in leaves were observed for total amino acid levels.

9. A comparison of *Pinus monticola* leaves from a heated greenhouse with the same species' leaves from the forest in winter showed that the former's contained no detectable raffinose but were otherwise roughly similar to the forest leaves for sugars. Forest *P. monticola* leaf sugars were essentially the same as those of forest *P. ponderosa* leaves. Microscopic studies showed normal chloroplasts in *P. monticola* greenhouse leaves, apparently semifluid endodermis cells, and a freezing resistance of only  $-24^{\circ}\text{C}$ . as compared to at least  $-47^{\circ}\text{C}$ . in the forest leaves of the same species.

#### Literature

- Bailey, I. W., 1954: Contributions to Plant Anatomy. Chronica Botanica Co., Waltham, Mass.
- Bersa, E., and F. Weber, 1922: Reversible Viskositätserhöhung des Cytoplasmas unter Einwirkung des elektrischen Stromes. Ber. dtsh. Bot. Ges. 40, 254—258.
- Bidwell, R. G. S., G. Krotkov, and G. B. Reed, 1952: Paper chromatography of sugars in plants. Canad. J. Bot. 30, 291—305.
- Block, R. J., E. L. Durum, and G. Zweig, 1955: A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis. Academic Press Inc., N. Y.
- Bonner, J., 1950: Plant Biochemistry. Academic Press Inc., N. Y.
- Cain, A. J., 1950: The biochemistry of lipoids in animals. Biol. Rev. 25, 73—112.
- Clements, H. F., 1938: Mechanisms of freezing resistance in the needles of *Pinus ponderosa* and *Pseudotsuga mucronata*. Res. Studies Wash. State College 6, 3—45.
- Currier, H. B., K. Esau, and V. I. Cheadle, 1955: Plasmolytic studies of phloem. Amer. J. Bot. 42, 68—81.
- Doyle, J., and P. Clinch, 1926: The pentosan theory of cold resistance applied to conifers. Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. 18, 219—235.
- Fabricius, L., 1906: Untersuchungen über den Stärke- und Fettgehalt der Fichte auf der oberbayerischen Hochebene. Bot. Cent. 102, 29—30.
- Gail, F. W., 1926: Osmotic pressure of cell sap and its possible relation to winter killing and leaf fall. Bot. Gaz. 81, 434—445.
- Gerngross, O., and E. Gülbaran, 1952: Analytic studies of tannin content of the Turkish pines, *Pinus nigra*, *Pinus sylvestris*, *Pinus pinea*, and *Pinus brutia*. Das Leder 3, 169—174 (as cited in Chem. Abstr.).
- Goldsmith, G. W., and J. H. C. Smith, 1926: Some physico-chemical properties of spruce sap and their seasonal altitudinal variation. Colorado College Public. Sci. Series 13, 13—71.
- Guttenberg, H. von, 1927: Studien über das Verhalten des immergrünen Laubblattes der Mediterranflora zu verschiedenen Jahreszeiten. Planta 4, 726—779.
- Harvey, S. C., and V. A. Higby, 1951: A microcolorimetric method for the quantitative determination of glycerol. Arch. Biochem. 30, 14—24.
- Höfler, K., 1954: La résistance du protoplasme à la sécheresse. 8ème Congrès Intern. de Botanique, Sect. 11 and 12, 239—241.
- Kano, T., and K. Hatano, 1953: Amino acids in the seeds of *Pinus Thunbergii* at the germination stage. J. Japan. Forest Soc. 35, 292—298.
- Kessler, W., and W. Ruhland, 1938: Weitere Untersuchungen über die inneren Ursachen der Kälteresistenz. Planta 28, 159—204.
- Kirchoff, F., 1915: Über das Verhalten von Stärke und Gerbstoffen in den Nadeln unserer Koniferen im Laufe des Jahres. Bot. Cent. 128, 154—155.

- Korstian, C. F., 1924: Density of cell sap in relation to environmental conditions in the Wasatch Mountains of Utah. J. Agr. Res. 28, 845—907.
- Kurimoto, T., H. Takada, and S. Nagai, 1954: Physiology of *Metasequoia glyptostroboides* and related species of conifers. 1. Osmotic value and salt composition of leaf saps. Reprinted from J. Instit. Polytech., Osaka City Univ. 5, 55—65.
- Kurth, E. F., and J. K. Hubbard, 1951: Extractives from *ponderosa* pine bark. Ind. Eng. Chem. 43, 896—900 (as cited in Chem. Abstr.).
- Larcher, W., 1954: Die Kälteresistenz mediterraner Immergrüner und ihre Beeinflussbarkeit. Planta 44, 607—635.
- Levitt, J., 1941: Frost killing and hardiness in plants. Mimeogr.
- and D. Siminovich, 1940: The relation between frost resistance and the physical state of the protoplasm. I. The protoplasm as a whole. Canad. J. Res., Sect. C. 18, 550—561.
- — 1941: The relation etc., II. The protoplasmic surface. Canad. J. Res., Sect. C. 19, 9—20.
- Lewis, F. J., and G. M. Tuttle, 1920: Osmotic properties of some plant cells at low temperatures. Ann. Bot. 34, 405—416.
- — 1925: On the phenomena attending seasonal changes in the organisation in leaf cells of *Picea canadensis* (Mill.) B. S. P. New Phytol. 22, 225—232.
- Lidforss, B., 1896: Zur Physiologie und Biologie der wintergrünen Flora. Bot. Cbl. 68, 35—44.
- Linskens, H. F., 1955: Papierchromatographie in der Botanik. Springer-Verlag, Berlin.
- Luyet, B. J., and P. M. Gehenio, 1952: Effect of glycerol in limiting ice formation in tissues subjected to low temperatures. Biodynamica 7, 107—118.
- Mer, M. E., 1876: De la constitution et des fonctions des feuilles hivernales. Bull. Soc. Bot. France 23, 231—238.
- Meyer, A., 1918: Die angebliche Fettspeicherung immergrüner Laubblätter. Ber. dtsh. bot. Ges. 36, 5—10.
- Meyer, B. S., 1928: Seasonal variations in the physical and chemical properties of the leaves of pitch pine with especial reference to cold resistance. Amer. J. Bot. 15, 449—472.
- 1932: Further studies on cold resistance in evergreens with special reference to the possible rôle of bound water. Bot. Gaz. 94, 297—321.
- and D. B. Anderson, 1941: Laboratory Plant Physiology. D. Van Nostrand Co., Inc., N. Y.
- Mitchell, P. H., 1950: A Textbook of Biochemistry. 2nd Ed. McGraw-Hill Book Co., Inc., N. Y.
- Miyaké, K., 1902: On the starch of evergreen leaves and its relation to photosynthesis during the winter. Bot. Gaz. 33, 321—340.
- Newton, R., 1924: Colloidal properties of winter wheat plants in relation to frost resistance. J. Agr. Sci. 14, 178—191.
- Paech, K., 1950: Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe. Springer-Verlag, Berlin.
- Parker, J., 1951: Moisture retention in leaves of conifers of the northern Rocky Mountains. Bot. Gaz. 113, 210—216.
- 1952: Desiccation in conifer leaves: anatomical changes and determination of the lethal level. Bot. Gaz. 114, 189—198.
- 1953: Some applications and limitations of tetrazolium chloride. Science 118, 77—79.

- Parker, J., 1955a: Tetrazolium salts as viability indicators: radiation catalysed reactions. *Nature* 176, 647—648.
- 1955b: Annual trends in cold hardiness of ponderosa pine and grand fir. *Ecology* 36, 377—380.
- Pisek, A., 1950: Frosthärte und Zusammensetzung des Zellsaftes bei *Rhododendron ferrugineum*, *Pinus cembra* und *Picea excelsa*. *Protoplasma* 39, 129—146.
- Plouvier, V., 1952: Research on pinitol in some conifers and the like plants. *C. r.* 234, 362—364 (as cited in Chem. Abstr.).
- 1953: The pinitol of conifers and quebrachitol of Aceraceae; research on these two itols in some other families. *C. r.* 236, 317—319 (as cited in Chem. Abstr.).
- Priestley, J. H., 1930: Studies in the physiology of cambial activity. III. The seasonal activity of the cambium. *New Phytol.* 29, 316—354.
- Scarsh, G. W., and J. Levitt, 1937: The frost-hardening mechanism of plant cells. *Plant Physiol.* 12, 51—78.
- Schmidt, E., 1936: Baumgrenzenstudien am Feldberg im Schwarzwald. *Tharandter forst. Jb.* 87, 1—43.
- Schulz, E., 1888: Über Reservestoffe in immergrünen Blättern unter besonderer Berücksichtigung des Gerbstoffes. *Flora* 71, 223—241; 243—258.
- Siminovitch, D., and D. R. Briggs, 1949: The chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to frost hardiness. I. Seasonal variations in protein content. *Arch. Biochem.* 23, 8—17.
- — 1954: Studies etc. VII. A possible direct effect of starch on the susceptibility of plants to freezing injury. *Plant Physiol.* 29, 331—337.
- Steiner, M., 1933: Zum Chemismus der osmotischen Jahresschwankungen einiger immergrüner Holzgewächse. *Jb. wiss. Bot.* 78 (cited by Pisek, 1950).
- Steward, F. C., J. F. Thompson, F. K. Millon, M. D. Thomas, and R. H. Hendricks, 1951: The amino acids of alfalfa as revealed by paper chromatography with special reference to compounds labelled with S<sup>35</sup>. *Plant Physiol.* 26, 123—135.
- Underwood, J. C., and L. B. Rockland, 1954a: Small-scale filter paper chromatography. Factors affecting separation and sequence of amino acids. *Anal. Chem.* 26, 1553—1557.
- — 1954b: Small etc. A rapid two-dimensional procedure. *Anal. Chem.* 26, 1557—1563.
- Weber, F., 1935: Review of Kessler, (1935). *Protoplasma* 24, 631.
- and H. Hohenegger, 1923: Reversible Viscositätserhöhung des Protoplasmas bei Kälte. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 41, 198—204.
- Winkler, A., 1913: Über den Einfluß der Außenbedingungen auf die Kälteresistenz ausdauernder Gewächse. *Jb. wiss. Bot.* 52, 467—506.
- Woodward, C. C., and G. S. Rabideau, 1953: The comparison of plant fractions extracted with 80% alcohol. *Plant Physiol.* 28, 535—538.
- Worley, C. L., 1937: Carbohydrate changes within the needles of *Pinus ponderosa* and *Pseudotsuga taxifolia*. *Plant. Physiol.* 12, 755—770.
- Zacharowa, T. M., 1929: Über den Gasstoffwechsel der Nadelholzpflanzen im Winter. *Planta* 8, 68—83.

## Robert Feulgen

(1884—1955)

Am 24. Oktober 1955 starb Professor Dr. Robert Feulgen, der Schöpfer der Nuklealreaktion. Robert Feulgen ist am 2. September 1884 in Werden a. d. Ruhr geboren. Die Reifeprüfung hat er 1905 in Soest absolviert. Er studierte Medizin an den Universitäten Freiburg und Kiel, wo er bei Hoppe-Seyler arbeitete. Nach seinem Staatsexamen im Jahre 1910 promovierte er 1912 zum Doktor der Medizin und wurde Assistent an der che-



mischen Abteilung des Physiologischen Instituts der Universität Berlin (Prof. Rubner). 1919 trat er als Assistent in das Physiologische Institut der Universität Gießen ein, dem er bis zum Tode treu geblieben ist. Prof. Bürker, Vorstand dieses Instituts, hat ihm nach seiner Habilitation die Leitung der physiologisch-chemischen Abteilung des Instituts übergeben. 1923 wurde Feulgen zum planmäßigen außerordentlichen Professor der physiologischen Chemie berufen. Auf der Tagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Tübingen im September 1923 wurde die Nuklealfärbung bekanntgegeben. Im folgenden Jahr erscheinen seine Arbeiten darüber in der Zeitschrift für physiologische Chemie und in Pflügers Archiv. 1924 wurde

die erste Mitteilung über Plasmalogen und Plasmal veröffentlicht. Im Jahre 1927 wurde Feulgen zum Ordinarius ad personam und 1928 zum Direktor des neuerrichteten Physiologisch-Chemischen Instituts ernannt. Im Jahre 1931 wurde er Dekan der medizinischen Fakultät. 1938 wurde Feulgen zum Mitglied der Deutschen Leopoldinischen Akademie der Naturforscher in Halle ernannt. 1951 wurde das planmäßige Extraordinariat in ein planmäßiges Ordinariat umgewandelt. Am 1. Dezember 1953 findet die Emeritierung wegen Erreichung der Altersgrenze statt. Am 2. September 1954 wurde er anlässlich seines 70. Geburtstages zum Ehrendoktor der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen ernannt „in Anerkennung der Verdienste, die er sich durch die für Chemie, Biologie und Genetik gleich bedeutsamen Untersuchungen über Nukleinstoffe und Azetalphosphatide erworben hat“.

Cytologie und Histochemie verlieren in Robert Feulgen einen hervorragenden Repräsentanten, der eine neue Epoche in diesen Disziplinen inaugurierte. Mit seiner Nuklealreaktion hat er neue Wege und neue Möglichkeiten für das Studium des Zellkernes und des Chromatins gezeigt. Ohne diese Reaktion ist jetzt kein ernstes Studium des Zellkernes mehr möglich. Aber auch für andere biologische Disziplinen ist diese Reaktion von größter Bedeutung. Die Nuklealreaktion ermöglichte, die Anwesenheit des Chromatins nicht nur in allen pflanzlichen und tierischen Zellkernen, sondern auch in den Zellen von Akaryonten, weiter in einigen Viren bzw. in Bakteriophagen nachzuweisen. Nicht nur rein cytologische Fragen, wie z. B. die Lokalisation des Chromatins im Zellkern, die Unterscheidung von Chromatin- und Achromatinteilchen, können dank dieser Methode gelöst werden, sondern sie ermöglicht auch den elektiven Nachweis der feinsten chromatischen Kernstrukturen und ihrer Überreste nach verschiedenen Einwirkungen (Chromatinverpulverung und -auflösung usw.). Ferner können prinzipiell wichtige Entwicklungsfragen aufgeklärt werden, z. B. die Struktur der Zellkerne von Protozoen und Metazoen, die Frage über die Natur des Karyosoms, über die Möglichkeit der Bildung des Chromosoms aus dem Kernkörperchen, über die Anwesenheit des Chromatins in Bakterien und Cyanophyceen, was mit dem Problem der chemischen Einheit aller Lebewesen verknüpft ist, u. a. m. Mit anderen Worten hat die Nuklealreaktion zur Lösung von allgemeinen biologischen und entwicklungsgeschichtlichen Problemen, die auch von theoretisch-biologischer und sogar philosophischer Bedeutung sind, entscheidend beigetragen. Wir können also in der Feulgenschen Reaktion eine der wichtigsten biologischen Entdeckungen unserer Zeit anerkennen, die bedeutende Fortschritte unserer Kenntnisse über die Zelle ermöglichte. Sehr erfolgreich wurde die Anwendung dieser Methode in der Experimentalcytologie. Die Nuklealreaktion stellt die beste mikroskopisch-chemische Methode für den Nachweis der Desoxyribonukleinsäure dar. Das Wort Feulgen bedeutet jetzt nicht nur den Namen eines Gelehrten; das ist — wie „Röntgen“ — schon ein wissenschaftlicher Begriff, der täglich in der wissenschaftlichen Literatur und Praxis angewendet wird. Wenn wir ferner die Feulgensche Plasmalreaktion, die Azetalphosphatid-Untersuchungen, die Studien der Nukleinsäuren, neben vielen anderen Arbeiten in Betracht

ziehen, so wird die große Bedeutung des Werkes Feulgens für Chemie, Biologie und Genetik ganz klar. Besonders müssen die Cytologen und Histochemiker Feulgen dankbar sein, hat er ihnen doch eine so wichtige Methode in die Hand gegeben. Es ist dabei bezeichnend, daß diese, besonders für Cytologen und Histochemiker wichtige mikroskopisch-chemische Reaktion von einem physiologischen Chemiker stammt. Symbolisch weist diese Tatsache auf die sich schon anbahnende enge Zusammenarbeit von Chemikern und Histologen hin, welche zur Entstehung eines neuen wissenschaftlichen Zweiges, der Histo- und Cytochemie, geführt hat. In den letzten Lebensjahren faßte Feulgen den Entschluß, die von ihm entdeckte Plasmalreaktion für die Untersuchung von bösartigen Geschwülsten anzuwenden. Leider konnten diese Studien nicht zu Ende geführt werden.

Als Fachmann war Feulgen ein ausdauernder, kritischer und ideenreicher Gelehrter, dabei aber ein sehr bescheidener Mensch. Sein Werk ist durch Genialität ausgezeichnet.

Bewahren wir ihm ein dankbares Andenken!

P. Milovidov, Prag.

## Kurze Mitteilungen

### Mikrosomen und Meiosomen

Von

**Karl Höfler**

(Eingegangen am 14. Juli 1956)

Der Ausdruck Mikrosomen („Kleinkörperchen“) stammt von Hanstein (1880, S. 9), der damit alle im Hyaloplasma eingelagerten, „in den Zellen ruhenden oder schwimmenden, rundlichen, der Regel nach ziemlich gleichartigen Körperchen aus dichter Substanz“ versteht. Der Terminus hat im botanisch-cytologischen Schrifttum Eingang gefunden — gleichwie der Hansteinsche Begriff „Protoplast“ (l. c. S. 9) — und ist sechs Jahrzehnte lang allgemein gebraucht worden.

Als in jüngerer Zeit die Elektronenoptik neue Größenordnungen der Beobachtung zugänglich machte, wurde nun — zuerst wohl von Claude (1943) der Ausdruck Mikrosomen in anderem Sinne gebraucht, nämlich als Bezeichnung für submikroskopische Teilchen im Plasma, die in der Größenordnung von 500–1500 Å liegen. Frey-Wyssling (1955, S. 28–31) berichtet über ihre Morphologie, Zusammensetzung und Funktion; vgl. Perner (1953, S. 466 f.).

Wie Drawert und Metzner (1955) sagen, hat sich dieser neue Terminus in der human- und zoophysiologischen sowie in der biochemischen Literatur so eingebürgert, daß man, um Verwechslungen und falsche Schlußfolgerungen zu vermeiden, den Begriff Mikrosomen im Hansteinschen Sinne auch in der botanischen Literatur fallen zu lassen hätte. Vgl. Frey-Wyssling (1955, l. c.) und Mühlethaler (1955).

Man hat nun nach terminologischem Ersatz gesucht. Perner (1952, 1953) schlug vor, die permanent vorkommenden, mikroskopisch sichtbaren, granulartigen Einschlüsse des Plasmas höherer Pflanzen, außer Mitochondrien, Plastiden und offensichtlichen Lipoidtropfen, als „Sphärosomen“ zu bezeichnen. Damit träte dieser Ausdruck als Ersatz an die Stelle des früheren Namens Mikrosomen.

Das Wort Sphärosomen stammt von P. A. Dangeard (1919) und bedeutet Kugelförperchen; die Kugelform weist wohl auf flüssigen Zustand und Nichtmischbarkeit mit der Masse des Grundcytoplasmas hin. Allbekannt sind die Sphärosomen der Innenepidermiszellen von *Allium cepa*, die durch Vitalfärbung und dank ihrer elektiven Fluorochromierbarkeit (Drawert 1952, 1953, 1955, Perner l. c.) so gut sichtbar zu machen sind. Wir haben

sie im Wiener Institut seit Jahren mit Akridinorange zu leuchtend grüner Fluoreszenz gebracht. Die französischen Cytologen haben schon lange gelernt, sie von den Chondriosomen zu unterscheiden. Guilliermond, Mangenot und Plantefol (1933, Fig. 76 f) sprachen von *granulations lipoidiques*. P. A. Dangeard stellt diesen das „Sphärom“ gegenüber. Perner und Strugger (1954) trennen das Sphärom vom Chondriom und den Proplastiden. Die Sphärosomen stellen eine Art von Hansteinschen Mikrosomen dar.

Gutz (1956) nennt die von ihm in Pilzhypen färberisch nachgewiesenen Kleinteilchen Granula; diese besitzen Eigenschaften, wie sie teils den Mitochondrien, teils den Sphärosomen der höheren Pflanzen zukommen. Sie stellen also Mikrosomen im älteren, weiteren Sinne dar, deren Einreihung in eine der neuen Kategorien noch nicht möglich ist. — Ich kenne u. a. vorgebildete Kleinkörperchen im Cytoplasma der Desmidiacee *Tetmemorus granulatus*, welche basische Farbstoffe vital stark speichern und dann bei Vakuolenkontraktion und -zerklüftung (Cholnoky und Höfler 1950, Kiermayer 1954) das wandständige Plasma, in dem sie vorhanden sind, und den durch den kontrahierten Tonoplasten abfiltrierten Zellsaft, dem sie fehlen, lichtmikroskopisch unterscheiden lassen, was erweist, daß in diesem Falle nicht — wie nach Akerman (1917) beim Aggregationsvorgang in *Drosera*-Zellen — der ganze Raum zwischen Zellwand und Tonoplast von gequollenem Plasma erfüllt ist. Ob diese Gebilde den *Allium*-Sphärosomen vergleichbar sind, ist unbekannt.

Ich möchte nun darauf hinweisen, daß wir in diesen und in hundert anderen Fällen den Ausdruck Mikrosomen im weiteren, Hansteinschen Sinn nicht aufgeben können. Die Cytologie braucht einen weiten und allgemeinen Begriff für im Lichtmikroskop sichtbare Kleinteilchen, von denen gesprochen wird, ehe ihre chemische und physiologische Natur noch erfaßt ist. Aus Prioritätsgründen soll ein Terminus auch im cytologischen Schrifttum in dem Sinne gebraucht werden, in dem er zuerst definiert worden ist. Nachträgliche Umdefinierung erscheint ebenso unzulässig wie etwa nachträgliche Umbenennung klar beschriebener Pflanzenspezies. Wir wollen nicht versuchen, Einfluß auf den Sprachgebrauch im angloamerikanischen zoophysiologischen Schrifttum zu üben. In der botanischen Cytologie wäre der Terminus Mikrosomen nicht aufzugeben.

Für die sublichtmikroskopischen Teilchen im Plasma, die den von Claude als „microsomes“ bezeichneten gleichzusetzen sind, schlage ich die Bezeichnung Meiosomen vor. Das Wort ist gebildet von μέγας, -ον kleiner, recht klein, dem griechischen Komparativ von μικρός klein.

Mühlethaler (1955, S. 267) nennt die von ihm beobachteten osmophilen Körnchen im Plasma von 80–150 Å Durchmesser Ultramikrosomen. Ich teile mit ihm das Bedürfnis, die erst elektronenmikroskopisch sichtbaren Teilchen neu zu benennen, möchte aber doch den Ausdruck Ultramikrosomen nicht annehmen, weil man dabei unwillkürlich an Teilchen, die erst bzw. schon im Ultramikroskop, d. h. im Dunkelfeld, sichtbar werden, denken möchte; auch möchte ich das aus lateinischen und griechischen Stücken zusammengesetzte nomen mixtum vermeiden.

Frey-Wyssling hat schon 1949 (S. 80) von Submikrosomen gesprochen, den Namen aber (1955) nicht aufrechterhalten. Perner (1953) hat ihn für die „sublichtmikroskopischen Granula“ verwendet.

Wir möchten also die „microsomes“ im Claudeschen Sinne als „Meiosomen“ bezeichnen und wollen unseren weiteren Gattungsbegriff „Mikrosomen“ im Hansteinschen Sinne beibehalten. Arten von Mikrosomen, die morphologisch und künftig vielleicht auch physiologisch erfasst werden, wären als Sphärosomen usw. zu definieren. Neu beobachtete, chemisch unbestimmte, lichtmikroskopisch sichtbare Kleinkörperchen sollen aber auch weiterhin zunächst nicht als Sphärosomen und nur, wenn nach der Gestalt ein fester Aggregatzustand anzunehmen ist, als Granula, sonst aber wie bisher als Mikrosomen bezeichnet werden.

#### Literatur

- Akerman, A., 1917: Untersuchungen über die Aggregation in den Tentakeln von *Drosera rotundifolia*. Bot. Notiser Lund 145.
- Cholnoky, B. v., und K. Höfler, 1950: Vergleichende Vitalfärberversuche an Hochmooralgen. S.ber. Öst. Akad. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt. I, 159, 145.
- Claude, A., 1943: The constitution of protoplasm. Science 97, 451.
- Dangeard, P. A., 1919: Sur la distinction du chondriome des auteurs en vacuome, plastidome et sphérome. C. r. Acad. Sci. Paris 169, 1005.
- Drawert, H., 1952: Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Nilblausulfat. Ber. dtsh. bot. Ges. 65, 265.
- 1953: Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Janusgrün, Nilblausulfat und Berberinsulfat. Ebenda 66, 135.
- 1955: Die vitale Fluorochromierung der Sphärosomen (Mikrosomen) mit einem aliphatisch im N substituierten Aminopyren. Naturw. 42, 419.
- und H. Gutz, 1953: Zur vitalen Fluorochromierung der Mikrosomen mit Nilblau. Naturw. 40, 512.
- und I. Metzner, 1955: Vitalfluorochromierungen mit Brillanteresylblaupräparaten verschiedener Herkunft. Ber. dtsh. bot. Ges. 58, 385.
- Frey-Wissling, A., 1949: Sublichtmikroskopische Morphologie. Fortschr. d. Bot., XII, 68.
- 1955: Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas. Protoplasmatologia II/A/2.
- Guilliermond, A., G. Mangenot et L. Plantefol, 1933: Traité de cytologie végétale. Paris.
- Gutz, H., 1956: Zur Analyse der Granula-Fluorochromierung mit Nilblau in den Hyphen von *Mucor racemosus* Fres. Planta 46, 481.
- Hanstein, J. v., 1880: Einige Züge aus der Biologie des Protoplasmas. Botan. Abhandlungen a. d. Gebiet d. Morphologie u. Physiologie 4, Heft 2, Bonn.
- Kiermayer, O., 1954: Die Vakuolen der Desmidiaceen, ihr Verhalten bei Vitalfärb- und Zentrifugierungsversuchen. S.ber. Öst. Akad. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt I, 162, 175.
- Mühlethaler, K., 1955: Untersuchungen über die Struktur und Entwicklung der Proplastiden. Protoplasma 45, 264.
- Perner, E. S., 1952: Die Vitalfärbung mit Berberinsulfat und ihre physiologische Wirkung auf Zellen höherer Pflanzen. Ber. dtsh. bot. Ges. 65, 52.
- 1953: Die Sphärosomen (Mikrosomen) pflanzlicher Zellen. Protoplasma 42, 475.
- Strugger, S., 1954: Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* L'Herit. Protoplasma 43, 120.

## Vitalfärbungsversuche mit reduziertem Neutralrot an „vollen“ Zellsäften einiger höherer Pflanzen

Von

Davor Miličić

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 14. Juli 1956)

Kiermayer (1955, 1956) hat gelegentlich seiner Vitalfärbungsversuche an den „vollen“ Zellsäften einiger Algen und der Außenepidermis von *Allium-cepa*-Zwiebeln beobachtet, daß sich die „vollen“ Zellsäfte gegen das reduzierte Neutralrot verschiedenartig verhalten. Obwohl die „vollen“ Zellsäfte der Desmidiaceen *Netrium digitus* und *Cylindrocystis Brebissonii* im stark alkalischen Bereiche das reduzierte Neutralrot (Fluoreszent X) stark speicherten, zeigten sie doch im UV-Licht keine Fluoreszenz. Andererseits konnte Kiermayer in der Außenepidermis von *Allium cepa* nach der Färbung mit Fluoreszent X im UV-Licht eine braune Fluoreszenz wahrnehmen. Auf Grund dieser Beobachtungen hat Kiermayer auf die Möglichkeit hingewiesen, daß mittels des Fluoreszent X eine Unterteilung der „vollen“ Zellsäfte durchgeführt werden könnte. Außerdem zeichnet sich das Fluoreszent X auch durch eine leichte Oxydierbarkeit in saurem Bereiche aus, so daß es nach Kiermayer auch infolge dieser Eigenschaft in zellphysiologischen Untersuchungen verwendbar sein könnte.

Kiermayers Beobachtungen und die Eigenschaften dieses Farbstoffes versprochen in weiteren Untersuchungen interessante Ergebnisse. Da in bisherigen Färbungsversuchen mit reduziertem Neutralrot von Zellen höherer Pflanzen nur die *Allium*-Epidermiszellen untersucht wurden, so haben wir Untersuchungen auch an einigen anderen Pflanzen durchgeführt. Daß die Epidermen der von uns untersuchten Pflanzen wirklich „voll“ sind, wurde durch die beobachtete grüne Fluoreszenz ihrer Zellsäfte nach der Färbung mit Akridinorange konstatiert.

Die Lösung des Farbstoffes wurde nach der Methode Kiermayers (1955; 281–282) bereitet. Regelmäßig wurden nur frisch verfertigte Farbstofflösungen verwendet, die reingelb gefärbt waren und bei Tageslicht intensiv grün fluoreszierten. Die Färbungsergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Bei den angeführten Pflanzen konnte demzufolge eine verschiedenartige Fluoreszenz der „vollen“ Zellsäfte wahrgenommen werden. Während die *Allium*-Epidermis braun fluoreszierte, zeigten die Epidermen einer Pflanzengruppe (*Cynanchum* und andere) überwiegend eine gelbe und die der anderen Gruppe (*Platanthera* und andere) meistens eine olivgrüne Fluoreszenzfärbung; die Stengelepidermiszellen von *Trifolium pratense* leuchteten im UV-Licht reingrün.

Da auch bei ein und derselben Pflanze die Zellsaft-Fluoreszenz in gewissen Grenzen variieren kann, konnten wir während unserer Untersuchungen alle möglichen Übergänge von Grün nach Gelb und Braun beobachten. Ob dieser Unterschied in der Fluoreszenzfärbung von den chemischen Verbindungen zwischen reduziertem Neutralrot und verschiedenen

Zellsaft-Speicherstoffen, von der Reoxydation des Farbstoffes oder von anderen Faktoren abhängig ist, könnte nur auf Grund weiterer Untersuchungen festgestellt werden.

*UV-Fluoreszenz der Zellsäfte nach Färbung mit Fluoreszent X*  
(Farbstofflösung 1 : 60.000, 30 Min., pH 9,8.)

<i>Allium cepa</i>	Außenepidermis der Zwiebel	braun
<i>Cynanchum vine-toxicum</i>	Obere Blattepidermis	gelb bis gelbgrünlich
<i>Vicia faba</i>	Obere Blattepidermis	gelb bis gelbgrünlich
<i>Coronilla coronata</i>	Obere Blattepidermis	gelb bis gelbgrünlich
<i>Dictamnus alba</i>	Obere Blattepidermis	gelb bis gelbgrünlich
<i>Laurocerasus officinalis</i>	Obere Blattepidermis	gelb bis gelbgrünlich
<i>Linum flavum</i>	Obere Blattepidermis	olivgrün
<i>Platanthera bifolia</i>	Obere und untere Blattepidermis	olivgrün mit einem Stich in Braun
<i>Physalis alkekengi</i>	Obere Blattepidermis	olivgrün, am Rande gelbbraunlich
<i>Trifolium rubens</i>	Obere Blattepidermis	olivgrün, am Rande gelbgrün
<i>Trifolium pratense</i>	Stengelepidermis	grün

Die vorliegenden Versuche wurden während meines kurzen Aufenthalts im Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien ausgeführt. Herrn Prof. Dr. Karl Höfler und Herrn Dr. H. Kinzel danke ich schönstens auch an dieser Stelle für die Unterstützung während der Arbeit.

#### Literatur

- Kiermayer, O., 1955: Über die Reduktion basischer Vitalfarbstoffe in pflanzlichen Vakuolen. S.ber. Öst. Akad. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt. I, 164, 275.  
— 1956: Fluorochromierung pflanzlicher Zellen mit Fluoreszent X (reduziertem Neutralrot). Protoplasma 46, 437.

### Referate

**Grell, Karl G.: Protozoologie.** Mit 300 Abb. VII, 284 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag. 1956. Ganzl. DM 59.—.

Unter der Protistenliteratur nimmt Grells „Protozoologie“ eine Sonderstellung ein, führt sie uns doch unter Berücksichtigung der neuesten, noch im Fluß befindlichen Untersuchungen, unbelastet durch systematische Weitschweifigkeiten, in alle diejenigen Tatsachen morphologischer, physiologischer, genetischer und ökologischer Natur ein, die für eine allseitige Beurteilung des Protozoenorganismus wesentlich sind und deren Bedeutung für die derzeit aktuellen biologischen Probleme nicht nachdrücklich genug herausgestellt werden kann. Grundlage der meisterhaft gerauschten Darstellung sind Vorlesungen des Verfassers an der Universität Tübingen. Die dadurch gegebene didaktische Durcharbeitung des Stoffes zusammen mit der besonders eindrucksvollen Behandlung der in das engere Forschungsprogramm des Max-Planck-Instituts für Biologie fallenden, die Fortpflanzungsphysiologie umfassenden Fragen verleihen dem Buch eine wertvolle persönliche Note.

Den Cytologen fesselt in Grells Buch neben den den Plasmastrukturen, dem Pelliculabau, der Kernmorphologie und den Kernteilungsprozessen gewidmeten Kapiteln die umfassende Darstellung der Sexualität der Protisten. Dabei bietet die Behandlung der sexuellen Bipolarität bei isogamen Phytomonadinen Gelegenheit, die neuesten Ergebnisse der Gamonforschung zu berühren, während die Paarungstypen der Ciliaten uns an das Problem der Bedeutung der physiologischen Anisogamontie als einen eventuellen Sonderfall echter Sexualität heranzuführen. Im genetischen Abschnitt der Grellschen Darstellung fesselt vor allem das, was über die Transformierbarkeit der auf serologischem Wege nachweisbaren Eigenschaften der Ciliaten festgestellt worden ist. Die durch äußere Reize auslösbare phänotypische Manifestation von Genen und ihren Allelen, die sich durch eine Reihe von Teilungsschritten hindurch auswirken kann, erweist sich als geeignet, ein Modell für die allgemeine Reaktionsnorm der Zellen im Erbgeschehen abzugeben. Daß die bekannten Untersuchungen von Sonnborn über die Killer-Eigenschaft von *Paramecium* berücksichtigt wurden, ist selbstverständlich. Dabei wird wahrscheinlich gemacht, daß die die Killer-Eigenschaft bedingenden, Desoxyribonukleinsäure enthaltenden Plasmaeinschlüsse symbiontische Mikroorganismen sein könnten, die zu ihrem Gedeihen Stoffe benötigen, deren Produktion von einem für die Killer spezifischem Gen abhängig ist.

Verhältnismäßig knapp gehalten sind die der Bewegungsphysiologie, dem Verhalten, der Ökologie und der systematischen Formenübersicht gewidmeten Kapitel. Bei der großen Bedeutung, die der Parasitismus gerade bei den Protozoen hat, wäre eine Erweiterung des betreffenden Abschnittes bei einer Neuauflage wünschenswert.

Eine besondere Würdigung verdient die bildliche Ausstattung des Grellschen Buches. Was da an Abbildungen geboten wird, ist sachlich, zeichnerisch und drucktechnisch gleichermaßen hervorragend. In der Aus-

wahl der fremden Vorlagen und der reichlichen Beigabe von Originalzeichnungen und technisch vollendeter Mikrophographien zeigt sich so richtig das „In-der-Materie-Stehen“ des Verfassers. Allein das Abbildungsmaterial rechtfertigte schon dieses Werk, das sein Verfasser seinem Lehrer Max Hartmann gewidmet hat. Grells Wunsch, seine Protozoologie möge dazu beitragen, das unter den deutschen Biologen immer mehr im Schwinden begriffene Interesse an Protozoen neu zu beleben, dürfte sicherlich Erfüllung finden.

E. Reisinger (Graz).

**Handbuch der Pflanzenphysiologie.** Herausgegeben von W. Ruhland.

Band I: Genetische Grundlagen physiologischer Vorgänge. Konstitution der Pflanzenzellen. Bearb. von verschiedenen Fachleuten. Redigiert von H. Ullrich und H. J. Bogen. Mit 283 Abb. XXI, 850 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag. 1955. Ganzl. DM 160.—.

Das seit langem erwartete Handbuch der Pflanzenphysiologie hat nun zu erscheinen begonnen. Der Zeitpunkt dazu ist günstig gewählt. Wäre es nur um ein Jahrzehnt früher erschienen, würde es heute schon veraltet sein, denn gerade im letzten Jahrzehnt hat die Pflanzenphysiologie auf vielen Teilgebieten ihr Gesicht in wesentlichen Zügen geändert. Der innige Kontakt zwischen Physiologie und Morphologie gehört zu den wichtigen Merkmalen der heutigen Physiologie. Dies kommt schon im ersten Band des Handbuches in deutlicher Weise zum Ausdruck. So bringt dieser glänzend ausgestattete Band mehr Morphologisches, als man vielleicht erwartet hat. Zur „Konstitution“ war auch die Chemie der Zelle und ihrer Organe zu rechnen. Es war gewiß nicht leicht, gerade in diesem Band die richtige Auswahl des Stoffes zu treffen. In ihrer Ausführlichkeit sind die einzelnen Artikel des Bandes durchaus nicht gleich; manche geben eine hinsichtlich der neuen Literatur erschöpfende Darstellung, andere nur eine Auswahl, die in manchen Kapiteln sogar recht kurz gehalten ist. Als besonders eingehende, wirklich handbuchmäßige Darstellungen seien unter anderen besonders hervorgehoben: Granick: Plastid structure, development and inheritance. Steffen: Chondriosomen und Mikrosomen. Serra: Der Zellkern. Drawert: Der pH-Wert des Zellsaftes. Die Artikel von Seifriz (Microscopic and submicroscopic structure of cytoplasm. The physical chemistry of cytoplasm. Pathology) sind durch ihre Originalität wertvoll und anregend, in der Auswahl des Stoffes und der Literatur jedoch sehr subjektiv gehalten. Die Artikel über die Zellwand haben von berufener Seite (Preston, Treiber) eine so eingehende Bearbeitung gefunden, wie man sie in einem Handbuch der Pflanzenphysiologie gar nicht vermuten würde. Der erste Teil des Bandes führt den Titel: „Genetische Grundlagen physiologischer Vorgänge.“ Die beiden Artikel „The Physiology of gene action“ (Catchside) und „Interaction of genic and non-genic hereditary units and the physiology of non-genic inheritance“ (Rhoades) werden großes Interesse finden, wurde doch die Bearbeitung dieser Themen bisher von pflanzenphysiologischen Lehr- und Handbüchern weitgehend ferngehalten. Der Reichtum an vorzüglichen Abbildungen zeigt, daß das große Werk auch in dieser Hinsicht in die allerbesten Hände gelegt ist.

F. Weber (Graz).

**Küster, E.: Experimentelle Zellforschung.** Hinweise auf ihre wichtigsten Aufgaben. Dritte, überarb. Aufl. Herausgegeben von Dr. G. Küster-Winkelmann. 73 S. Jena: VEB Gustav Fischer. 1956. DM 6.20.

Jeder mit der Erforschung der Pflanzenzelle Befasste kennt wohl die bereits erschienenen Auflagen dieses schmalen und dabei so inhaltsreichen

Bündchens, kennt und schätzt jene Zusammenschau von Methoden, Ergebnissen und Problemen der experimentellen Zellforschung, die nur ein Autor mit souveräner Beherrschung der Materie, mit intuitivem und genialem Blick für die Verästelungen der Fragestellungen und Verknüpfungen der Tatsachen, die, kurz gesagt, eben nur Küster schreiben konnte. In der vorliegenden dritten Auflage wurden unter Mitwirkung Prof. Bogens Hinweise auf neue Literatur, neue Forschungswege und Ergebnisse an Hand hinterlassener Notizen eingefügt und an manchen Stellen die Diktion einiger Sätze dem derzeitigen Sachverhalt angepaßt; im übrigen blieb der Text unverändert. Dankbar nehmen wir diese Schrift des Altmeisters wieder zur Hand als Vermächtnis, zeugend von echtem, beispielgebendem Forschergeist, der nicht resigniert, wenn nach langem erfolgreichem Forscherleben die Probleme nicht geringer geworden sind, sondern Pläne für das Gebäude, zu dem er so viel beigetragen, uns als Ansporn hinterläßt.

O. Härtel (Graz).

**Levitt, J.: The Hardiness of Plants.** Agronomy: A series of monographs. Vol. VI. Mit 37 Abb., 278 S., 128 Tab. New York: Academic Press Inc., Publ., 1956. \$7.—.

Das zu referierende Buch J. Levitts ist eine Neufassung seines seit 1941 in drei Auflagen erschienenen Buches über „Frost Killing and Hardiness of Plants“, das jetzt neben der Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegen niedere Temperaturen auch die gegen Trockenheit, gegen Hitze und andere schädigende Einflüsse umfaßt. Unter „hardiness“ versteht der Autor die Widerstandsfähigkeit der Pflanze bzw. des Protoplasmas gegen die unmittelbare Einwirkung extremer Umweltbedingungen, wie Frost, Trockenheit oder Hitze, und nur mit dieser befaßt sich das Buch. Das Wort „resistance“ behält er in einem umfassenderen Sinn jener Widerstandsfähigkeit gegen Außeneinwirkungen vor, wie sie bei trockenresistenten Pflanzen z. B. auch durch tiefgreifende Wurzeln, Wasserspeichern oder Überdauern von Dürrezeiten in Ruhezuständen gegeben ist. „Hardiness“ ist somit nur eine, wenn auch die wichtigste Form der „Resistenz“.

In einer bis auf älteste Literaturangaben zurückgreifenden Darstellung werden in klarem Überblick die experimentellen Beobachtungen und theoretischen Überlegungen über die Kälte-, Trocken- und Hitzeschädigung des pflanzlichen Plasmas einander gegenübergestellt und kritisch betrachtet. Die „frost-hardiness“ wird wie üblich bestimmt durch die Temperatur, bei der der Kältetod eintritt, die „drought-hardiness“ durch die relative Feuchtigkeit, bei der die Trockenschädigung in Erscheinung tritt. Um exakte und untereinander streng vergleichbare Werte zu erhalten, wird jedoch empfohlen, die „frost-hardiness“ ( $H_f$ ) einer Pflanze anzugeben durch die Anzahl der Grade, die die tödlich schädigende Temperatur ( $\Delta_k$ ) unterhalb des Gefrierpunktes des Zellsaftes der turgeszenten Pflanze ( $\Delta_0$ ) liegt, und die „drought-hardiness“ ( $H_d$ ) durch die Anzahl der Prozente der relativen Luftfeuchtigkeit, die die zum Trockentod führende relative Luftfeuchtigkeit ( $R_k$ ) unter der relativen Feuchtigkeit des Zellsaftes der turgeszenten Pflanze ( $R_0$ ) liegt, also  $H_f = \Delta_0 - \Delta_k$  bzw.  $H_d = R_0 - R_k$ .

Nach einer Behandlung der mit Frost- und Trockenhärte verbundenen zellmorphologischen und zellphysiologischen Faktoren und der Möglichkeiten einer Frost- und Trockenhärtung wird der Mechanismus der Kälte- und Trockenschädigung untersucht. Er wird in Übereinstimmung mit anderen Autoren in beiden Fällen auf eine mechanische Schädigung des Plasmas als Folge der Dehydratation zurückgeführt. Die direkte Hitzeschädigung ist demgegenüber vollständig unabhängig von einer Dehydratation. Die trotz-

dem oft zu beobachtende Parallelität von Frost- und Trockenwiderstandsfähigkeit auf der einen und Hitzewiderstandsfähigkeit auf der anderen Seite führt den Autor zu der Annahme, daß der Schädigung durch Dehydratation und durch Hitze gleiche Ursachen zugrunde liegen, die schließlich zu einer Denaturierung des Plasmaeiweißes führen. So sollen auch thermische Oszillationen zu einem Zerfall von Eiweißketten und einer Denaturierung der Moleküle führen. Eine Frost-, Trocken- oder Hitzehärte des Plasmas würde daher in gleicher Weise auf einer stärkeren intra- und intermolekularen, einer Denaturierung entgegenwirkenden Bindung der Proteine beruhen.

Abschließend wird auf das weite Feld hingewiesen, das der plasmatischen Resistenzforschung, abgesehen von Dehydratation und Hitze, vor allem auf dem Gebiet „nichtumweltbezogener Resistenzen“ (Biebl) gegen Substanzen und Einflüsse, die unter normalen Bedingungen im Leben der Pflanze keine Rolle spielen, noch offenstehen. Das Buch wird jedem auf dem Gebiet der Resistenzforschung Arbeitenden ein trefflicher Führer durch die vorliegenden Ergebnisse und eine wertvolle Quelle von Anregungen sein.

R. Biebl (Wien).

**Neumann, Karlheinz: Grundriß der Gefriertrocknung.** 2., stark erweiterte Auflage. Mit 65 Abb. 256 S. Göttingen-Frankfurt-Berlin: Muster-schmidt. 1955. Geb. DM 24.—.

Die Gefriertrocknung gestattet die Entwässerung biologischer Objekte unter weitestgehender Erhaltung der Struktur ohne nennenswerte Verlagerung von Stoffen und unter gleichzeitiger Sistierung autolytischer, enzymatischer und sonstiger Prozesse. Es ist daher verständlich, daß diese Methode für histologisch-histochemische, cytochemische und ähnliche Untersuchungen immer stärkere Verwendung findet. Darüber hinaus wird die Methode durch die Möglichkeit der Aufbewahrung biologischer Objekte ohne wesentliche Störung und Veränderung ihrer Eigenschaften auch für die Medizin und in neuester Zeit auch für die Industrie besonders interessant. Neumanns Buch bietet nun eine ausgezeichnete Einführung in die Theorie, die verschiedenen Apparaturen und die Durchführung der Gefriertrocknung; gestützt auf eine ausgedehnte Erfahrung und unter ausgiebiger Heranziehung der Literatur (die Bibliographie umfaßt 28 Seiten) wird die Durchführung der Gefriertrocknung für die verschiedensten Fälle ausführlich behandelt, wobei insbesondere auch auf die nachher durchzuführenden Untersuchungen Bedacht genommen wird. In stärkerem Maße als in der ersten Auflage wurde auf die industrielle Verwertung der Gefriertrocknung eingegangen. Die ausführliche Bebilderung, zwei Register sowie vorzügliche Ausstattung (abwaschbarer Einband) vervollständigen das wertvolle und jedem Interessenten wärmstens zu empfehlende Laboratoriumsbuch.

O. Härtel (Graz).

**Stapp, C.: Bakterielle Krankheiten.** Bakteriosen einschließlich Streptomykosen. (Handbuch der Pflanzenkrankheiten. Begründet von Sorauer. II. Band, 2. Lieferung.) 6. Aufl. Mit 179 Abb. 575 S. Berlin: Paul Parey. 1956. Geb. DM 124.—.

Nicht weniger freudig begrüßt als die 1. Lieferung (Viruskrankheiten) der Neuauflage des II. Bandes von Sorauers Handbuch wird nun die 2. Lieferung: „Bakterielle Krankheiten.“ Noch einmal hat es ein einzelner — C. Stapp — versucht, die riesige Materie zu formen. Der Versuch ist glänzend gelungen — trotz der fast erdrückend scheinenden Masse an Literatur. Daß das Werk von allen, die beruflich mit Pflanzenkrankheiten

und ihrer Bekämpfung zu tun haben, wirklich nicht entbehrt werden kann, braucht kaum gesagt zu werden. Was an dieser Stelle aber betont werden soll, ist, daß das Buch auch für den Zellforscher eine Quelle wichtiger Informationen darstellt. Es sei in dieser Hinsicht nur auf das ausführliche Kapitel hingewiesen, das die durch *Agrobacterium tumefaciens* hervorgerufenen Pflanzentumoren behandelt. Auf diesem Gebiete haben sich in den letzten und allerletzten Jahren die Arbeiten und die Hypothesen überstürzt; dieses Gebiet verdient ja auch wirklich großes Interesse der Biologen und Mediziner, handelt es sich doch um die Frage, wie eine normale Körperzelle in eine maligne Krebszelle umgewandelt wird. In deutscher Sprache existiert keine so gründliche Darstellung des Problems „Pflanzenkrebs“ wie die vorliegende von Stapp. Zustimmung aufgenommen wird es sicherlich auch werden, daß in diesem Band neben den „Bakteriosen“ nunmehr auch die „Streptomykosen“ eingeschlossen werden. Auch für dieses Kapitel wird sich sicherlich nicht nur der Phytopathologe, sondern auch der Mediziner ganz besonders interessieren. Die Einteilung des Stoffes erfolgt nicht nach den Krankheitserregern, sondern nach den Gattungen der erkrankten Pflanzen. Das entspricht gewiß dem Bedürfnis des Praktikers. Demjenigen, der mehr an allgemeinen Fragen interessiert ist, wird diese Einteilung weniger zusagen. So findet man die Hauptdarstellung des Problems der Tumoren unter „Bakteriosen der Rosaceen“, und der Fernerstehende vermutet wohl zunächst nicht, daß die durch *Agrobacterium tumefaciens* hervorgerufenen Geschwülste auch bei Pflanzen vieler anderer Familien vorkommen und daher auch an verschiedenen Stellen des Buches behandelt werden.

F. Weber (Graz).

**Tischler, Georg: Allgemeine Pflanzenkaryologie.** Ergänzungsband: Angewandte Pflanzenkaryologie. Fortgeführt von Heinz Diedrich Wulff. IV. Lieferung. Mit 13 Textabb. S. 625—848. Berlin-Nikolassee: Gebrüder Borntraeger. 1956. Subskriptionspreis DM 42.—.

Die vorliegende Lieferung, die vorletzte des Gesamtwerkes, bringt zunächst den Schluß des Abschnittes „Die Bedeutung der Chromosomenforschung für die Phylogenie“ mit dem Anhang: Beziehungen zwischen Karyologie und Embryologie. Es folgt das bedeutsame Kapitel „Die Beziehungen der Karyologie zur Ökologie und Geobotanik“, dessen Lektüre geradezu als spannend bezeichnet werden muß und die spät erkannte Bedeutung der Karyologie für Ökologie und Geobotanik in ausgezeichneter Weise darstellt. Daran schließen sich nachträgliche Zusätze, die die wichtigste Literatur der allerletzten Jahre (bis 1955) berücksichtigen. Den Schluß der Lieferung bildet der Anfang der Literaturliste bis zum Buchstaben E. Die allerletzte Lieferung wird mit dem Register das Riesenwerk beschließen und soll 1957 erscheinen.

F. Weber (Graz).

### Sixth Conference of the Society for Biological Rhythm

The Sixth Conference of the Society for Biological Rhythm is to be held from the 26th to the 28th of August 1957 in Semmering in Austria. The main theme will be: *Time in Biology*.

Application for papers to be read should be submitted prior to 30. 4. 1957 to the Secretary, who will be glad to supply further details at request. Address of the Secretary: A. Sollberger, Anatomical Dept., Caroline Institute, Stockholm 60.

**Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:**

- Politis, J.:** Über die Tanninoplasten oder Gerbstoffbildner der Rosaceen . . . 6. 9. 1955
- Nakazawa, Singo:** Vital Staining and Mechanical Inversion of *Vibrio* . . . 29. 3. 1956
- Erdmann, K., Ingeborg Meyer und S. Junghans:** Versuche zur Verhinderung von Ultraviolett-Wirkungen auf den Inhalt überlebender tierischer Zellkerne mit Strahlen-Schutzstoffen . . . 18. 6. 1956
- Reiter, Liselotte:** Vitale Fluorochromierung pflanzlicher Virus-Einschlußkörper . . . 16. 7. 1956
- Pirson, A., und G. Schaefer:** Osmotischer Wasserentzug und Plasmolyse mit Polyäthylenoxyd . . . 24. 7. 1956
- Werckmeister, P.:** Über einen eigenartigen Körper aus dem Trub von Bohnenauszugswasser . . . 6. 8. 1956
- Politis, J.:** Untersuchungen über die cytologische Bildung der Phytomelane bei einigen *Zinnia*-Arten . . . 14. 8. 1956
- Strügger, S.:** Der elektronenmikroskopische Nachweis von Plasmodesmen mit Hilfe der Uranylprägnierung an Wurzelmeristemen . . . 14. 8. 1956
- Thaler, Irmtraud, und F. Weber:** Vakuolenkontraktion in *Pinguicula*-Drüsenzellen . . . 30. 8. 1956
- Schurz, J.:** Eine röntgenographische Untersuchung von *Laminaria digitata* . . . 8. 9. 1956
- Overbeck, Gudrun:** Zellphysiologische Studien an *Bryophyllum* im Zusammenhang mit dem täglichen Säurewechsel . . . 17. 9. 1956
- Levitt, J.:** The Moment of Frost Injury . . . 24. 9. 1956
- Windisch, J., St. Hinkelmann und D. Stierand:** Plasmochromatische Zellreaktionen bei degenerierender Phosphat-Applikation nach P-Mangelzüchtung . . . 1. 10. 1956
- Honsell, E.:** Sulla presenza di succhi cellulari «vuoti» in *Nitella mucronata* e *Chara crinita* . . . 19. 10. 1956
- Spiekermann, Ruth:** Cytochemische Untersuchungen zum Nachweis von Nucleinsäuren in Proplastiden . . . 19. 10. 1956
- Tazawa, M.:** Neue Methode zur Messung des osmotischen Wertes einer Zelle . . . 25. 10. 1956
- Bartels, F.:** Ungewöhnlich große Chloroplasten bei *Epilobium*-Bastarden. . . 2. 11. 1956
- Butterfaß, Th.:** Über das Vorkommen umgekehrt gewundener Chromatophoren bei *Spirogyra* . . . 20. 12. 1956
- Strügger, S.:** Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Proplastiden des Vegetationskegels von *Elodea densa* . . . 12. 1. 1957
- Strügger, S.:** Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Plasmodesmen des Urmeristems der Wurzelspitze von *Allium cepa*; ein Beitrag zur Kritik der Fixation und zur Beurteilung elektronenmikroskopischer Größenangaben . . . 12. 1. 1957
- Butterfaß, Th.:** Über Grana, Karyoide und Pyrenoide von *Spirogyra* . . . 26. 1. 1957

SPRINGER-VERLAG IN WIEN

## Archiv für die gesamte Virusforschung

Begründet von R. Doerr

Unter Mitwirkung hervorragender in- und ausländischer Fachleute herausgegeben von

**C. Hallauer, Bern / K. F. Meyer, San Francisco / E. G. Nauck, Hamburg**

Zuletzt erschien:

**Band VII, Heft 1.** (Abgeschlossen im Juli 1956.) Mit 47 Textabbildungen.

124 Seiten. 1956.

S 144.—, DM 24.—, sfr. 24.80, \$ 5.70

Inhaltsverzeichnis:

**Weissenberg, R.** Granular Components of the Basophilic Lattice in the Lymphocystis Virus Inclusion Bodies of *Pleurocetes fleuss* L. — **Krieg, A.,** und **R. Langenbuch.** Über eine Polyedrose von *Dasychira pudibunda* L. (Lepidoptera, Lymantriidae). — **Balducci, D.,** **D. A. J. Terryll,** und **C. H. Stuart-Harris.** Complement Fixing Antigens of Herpes Simplex Virus. — **Kell, A.-W.,** **H. Lippelt,** **F. Müller** und **G. Brand.** Zum Problem des O-D-Phasenwechsels bei Influenza-A-Virus. — **Wigand, R.** Hämagglutination durch Vaccinevirus. I. Methode. — **Wigand, R.** Hämagglutination durch Vaccinevirus. II. Erfahrungen mit der Hämagglutinationshemmung. — **Arakawa, S.,** **T. Kaneko** und **T. Seki.** Untersuchungen über Trachom. IV. Mitt. — **Arakawa, S.,** **I. Kondo,** **T. Kaneko,** und **N. Goto.** Studies on Primary Atypical Pneumonia Virus. — **Kjellén, L.** Studies of Adenoviruses (APC-R1-ARD) in Tissue Culture. Correlation between the Amount of Virus Inoculated and the Time Needed for Production of Cellular Degeneration. — **Heller, L.,** **A. Espmark,** und **P. Viridén.** Immunological Relationship between Infectious Cough in Horses and Human Influenza A.

## Österreichische Botanische Zeitschrift

Herausgegeben von **Lothar Geitler, Wien**

Zuletzt erschien:

**Band 103, Heft 4.** (Ausgegeben im November 1956.) Mit 55 Abbildungen.

152 Seiten. 1956.

S 246.—, DM 41.—, sfr. 42.—, \$ 9.75

Inhaltsverzeichnis:

**Leinfellner, W.** Inwieweit kommt der peltat-diplophyll Bau des Angiospermen-Staubblattes in dessen Leitbündelanordnung zum Ausdruck? — **Blehl, R.** Morphologische, anatomische und zellphysiologische Untersuchungen an Pflanzen vom „Gamma-Feld“ des Brookhaven National Laboratory (USA.). — **Kenda, Griseldis, Irmtraud Thaler** und **F. Weber.** Eiweißkristalle in den Zellkernen der Drüsenhaare von *Saintpaulia*. — **Regel, C.** Die Bewaldung der Wüste. — **Kamptner, E.** *Thoracosphaera Deflandrei* nov. spec., ein bemerkenswertes Kalkflagellaten-Gehäuse aus dem Eocän von Donzacq (Dep. Landes, Frankreich). — **Tschermak-Woess, Elisabeth** und **Ruth Doležal.** Der Formwechsel des Heterochromatins im Verlauf der Mitose von *Vicia faba*. — **Geitler, L.** *Botrydina* — keine Symbiose einer Alge mit einem Moosprotonema. — **Weber, F.** Elaioplasten fehlen den Schließzellen von *Botrychium*. — **Weber, F.** Kernkristalle bei *Albucca*. — **Weber, F.** und **Irmtraud Thaler.** Zystolithoide Membranbildungen bei *Asperula*. — **Schlichtinger, F.** Karyologische Untersuchungen an endopolyploiden Chromozentrenkernen von *Gibbaeum heathii* im Zusammenhang mit der Differenzierung. — **Kurze Mitteilungen:** **Geitler, L.** Gelbgrüne Plastiden bei *Epipogium aphyllum*.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

